

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**ATP7B geen: mutatsioonispekter Eesti Geenivaramu kohordis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Miriam Nurm

Juhendaja: MD Anu Reigo

TARTU 2020

# INFOLEHT

## **ATP7B geen: mutatsioonispekter Eesti Geenivaramu kohordis**

Wilsoni tõbi on autosoom-retsessiivne haigus, mida põhjustab defekt ATP7B geenis. Haigus on varakult alustatud raviga täiesti kontrollitav, kuid ravimata jätmisel võib tulemus olla elukvaliteeti oluliselt halvendav või letaalne. Samas on seniseid üldisi levimusandmeid arvestades põhjust arvata, et Wilsoni tõbi on ka Eestis pigem aladiagnoositud. Antud töö põhieesmärkideks oli tuvastada Eesti rahvastikku esindava Eesti Geenivaramu biopanga kohordi andmete põhjal võimalikud patogeensed ATP7B geeni variandid ning võimalusel määrata hinnanguliselt, kas Geenivaramu fenotüübiandmestik on rakendatav Wilsoni tõve uurimiseks Eestis. Töö tulemusena klassifitseeriti potentsiaalsed patogeensed ATP7B geenivariandid Geenivaramu kohordis ja fenotüübi andmete alusel defineeriti esmane minimaalne valim edasisteks uuringuteks.

Märksõnad: Wilsoni tõbi, vase ainevahetushäire, geneetiline tagasiside

**B110** Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika

**B790** Kliiniline geneetika

## **ATP7B gene: mutation spectrum in the Estonian Biobank cohort**

Wilson's disease is an autosomal recessive disorder which is caused by a defect in the ATP7B gene. The disease is completely manageable with correctly timed treatment; however, without treatment the consequences may be severely detrimental to one's quality of life or even lethal. Additionally, general prevalence data so far strongly suggest that Wilson's disease could be underdiagnosed in Estonia. The main objectives of this thesis were to identify the potential pathogenic ATP7B gene variants based on the data from the Biobank of the Estonian Genome Center, which is representative of the Estonian population, and, if possible, to determine whether the Genome Center's phenotype data set is applicable in order to study Wilson's disease in Estonia. As a result of the study, potential pathogenic gene variants of ATP7B in the Estonian Biobank cohort were selected and classified, and a preliminary minimal cohort for further studies was defined based on phenotype data.

Keywords: Wilson's disease, copper metabolism disorder, reporting genetic findings

**B110** Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics

**B790** Clinical genetics

## SISUKORD

INFOLEHT .....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 WILSONI TÕBI JA ATP7B GEEN .....	7
1.2 WILSONI TÕVE FENOTÜÜBI KUJUNEMINE .....	9
1.2.1 Mõjutajageenid.....	10
1.3 WILSONI TÕVE PATOFÜSIOLOOGIA .....	10
1.4 WILSONI TÕVE AVALDUMINE.....	12
1.4.1 Neuroloogilised ja oftalmoloogilised häired .....	12
1.4.2 Psühhiaatrilised häired .....	13
1.4.3 Maksakahjustused .....	13
1.4.4 Muud sümptomid .....	13
1.4.5 Wilsoni tõvele viitavad histoloogilised leiud .....	14
1.5 WILSONI TÕVE DIAGNOOSIMINE .....	14
1.5.1 Biokeemilised analüüsid .....	14
1.5.2 Kliinilised uuringud.....	16
1.5.3 Geneetilised analüüsid.....	16
1.5.4 Diagnoosi defineerimine .....	17
1.5.5 Pseudodominantsus ja heterosügootne fenotüüp.....	17
1.6 WILSONI TÕVE RAVI .....	18
1.7 ATP7B VARIANTIDE RAPORTEERIMINE TAGASISIDES .....	19
1.7.1 Kliiniliselt oluliste variantide andmebaasid .....	19
1.7.2 <i>In silico</i> meetodid patogeensuse hindamisel .....	20
2. UURIMUS .....	22
2.1 TÖÖ EESMÄRGID .....	22
2.2 MATERJAL JA METOODIKA .....	22
2.2.1 Valim .....	22
2.2.2 Genotüpiseerimine, imputeerimine ja sekveneerimine Eesti Geenivaramus .....	22
2.2.3 Töö käik.....	23
2.3 TULEMUSED JA ARUTELU .....	27
KOKKUVÕTE.....	32
Summary .....	33
TÄNUSÕNAD .....	34
KASUTATUD KIRJANDUS .....	35

KASUTATUD VEEBILEHED .....	41
LISAD .....	42
Lisa 1 .....	42
Lisa 2 .....	44
Lisa 3 .....	46
Lisa 4 .....	48
<b>Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....</b>	<b>50</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

**ACMG** Ameerika Ühendriikide Meditsiinigeneetika Kolleegium, *American College of Medical Genetics*

**ATP7A** vase transporter-ATPaas alfa, *ATPase Copper Transporting Alpha*

**ATP7B** vase transporter-ATPaas beeta, *ATPase Copper Transporting Beta*

**ATOX1** antioksidant 1 vase šaperon, *antioxidant 1 copper chaperone*

**CTR1** kõrge afiinsusega vase transporter 1, *high affinity copper transporter 1*  
\*uus nimetus **SLC31A1** – perekond 31 alam perekond A soluutkandurvalk 1

**DMT1** divalentse metalli transporter 1, *divalent metal transporter 1*  
\*uus nimetus **SLC11A2** – perekond 11 alam perekond A soluutkandurvalk 2

**MLPA** ligeerimis-sõltuvate proovide hulgi amplifitseerimine, *multiplex ligand-dependent probe amplification*

**MRT** magnetresonantstomograafia, *magnet resonance tomography*

**NAFLD** mittealkohoolse rasvmaksa tõbi, *non-alcoholic fatty liver disease*

**NGS** järgmise põlvkonna sekveneerimine, *next generation sequencing*

**OHS** oksipitaalsarve sündroom, *occipital horn syndrome*

**PNPLA3** patatiinisarnane fosfolipaas 3, *patatin like phospholipase domain containing 3*

**REC** suhteline ülekantav vask, *relative exchangeable copper*

**ROS** reaktiivsed hapnikuosakesed, *reactive oxygen species*

**SNV** üksiku nukleotiidi variatsioon, *single nucleotide variation*

**XIAP** X-liiteline apoptoosi inhibiitor, *X-linked inhibitor of apoptosis*

## SISSEJUHATUS

Wilsoni tõbi on monogeenne autosoom-retsessiivne haigus, mida põhjustab defekt ATP7B geenis. ATP7B geen kodeerib P-tüüpi ATPaasi, mis vastutab vase transpordi eest rakus (Bull jt., 1993). Wilsoni tõbi jaguneb neuroloogiliseks ning hepaatiliseks vormiks, vastavalt on esiplaanil kas neurodegeneratsioon või maksakahjustused (Lorincz, 2018). Kaukaasia päritolu populatsioonides on sagedaseimaks haigusttekitavaks mutatsiooniks valgus aminohappe asendusena avaldunud muutus H1069Q, kuid Wilsoni tõbe käsitledes tuleb silmas pidada tema variantide suurt geograafilist varieeruvust (Wallace ja Dooley, 2020).

Wilsoni tõve genotüüp-fenotüüp seost on olnud raske määratleda, kuna haiguse varieeruv penetrantsus ning mitmekesine kliiniline pilt teevad diagnoosimise keeruliseks. Koos geneetiliste analüüside võimekuse kasvuga ning arvatava aladiagnoosimise tõttu on Wilsoni tõve levimus viimastel aastatel hinnatud varasemast suuremaks, uus hinnanguline esinemissagedus on umbes 1:7 000-8 000 (Gao jt., 2019) ning globaalne kandlus 1:90 (Kumar jt., 2020). Wilsoni tõbi on võimalik raviga kontrolli alla saada, kuid ravimata jätmisel lõpeb haigus surmaga (Collet jt., 2018), mistõttu on oluline haiguse varajane avastamine. Püsib terav vajadus tavapraktikas kasutamiseks välja arendada spetsiifilisi kliinilisi teste ning haiguse diagnoosi kuldstandardiks peetavaid geneetilisi analüüse (Guillaud jt., 2017).

Käesoleva töö eesmärgiks on koostada kaasajastatud eestikeelne kokkuvõte Wilsoni tõbe käsitleva teaduskirjanduse põhjal, mis võiks olla alusmaterjaliks seda haigust käsitleva pilootprojekti planeerimisel, lisaks tuvastada Eesti rahvastikku esindava Eesti Geenivaramu biopanga kohordi andmete põhjal võimalikud patogeensed ATP7B geeni variandid ning võimalusel määrata hinnanguliselt, kas Geenivaramu fenotüübiandmestik on rakendatav Wilsoni tõve uurimiseks Eestis.

Käesolev uurimus on läbi viidud Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu meditsiinigenoomika ja tagasiside töögrupi teadustöö raames vastavalt Tartu Ülikooli Inimuuringute eetika komitee loale „Meditiinilist sekkumist vajavate geenivariantide leidmine ja nende osas tagasiside andmine“ (258/T-22, 18.04.2016; 256/T-19, 19.12.2016 ja lisad).

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 WILSONI TÕBI JA ATP7B GEEN

Wilsoni tõve ehk hepatolentikulaarse degeneratsiooni põhjustajaks peetakse defektset ATP7B geeni. Tegemist on autosoom-retsessiivse haigusega, mille globaalne levimus arvati olevat Scheinbergi ja Sternliebi (1984) järgi pikka aega 1 : 30 000, kuid mis viimaste uurimuste alusel on hinnatud palju kõrgemaks - pigem vahemikku 1:7 000 – 8 000 (Gao jt., 2018; Poujois jt., 2018; Coffey jt., 2013). Globaalne haigusseoseliste variantide kandlus on viimastel aastatel määratud kui 1:90 (Kumar jt., 2020).

Andmebaasi Ensembl järgi (vaadatud 29.07.2020) paikneb inimese ATP7B geen 13q14.3 lookuses, tema kogupikkus genoomis on 80 kb. Geen sisaldab 20 intronit ning 21 kodeerivat eksonit, millelt toodetakse 1465 aminohapest koosnevat P-tüüpi ATPaasi (Bull jt., 1993; Petrukhin jt., 1993; Tanzi jt., 1993). Eksisteerib ka homoloogne ATPaas ATP7A, mille funktsioon on samuti tihedalt seotud vase transpordiga organismis.

Enamik Wilsoni tõve haigetest on ATP7B geeni alternatiivsete variantide suhtes kas liitheterosügootid (neil asub geenis kaks erinevat retsessiivset alleeli) või homosügootid (Coffey jt., 2013). Wilsoni tõve alleelidel on suur geograafiline varieeruvus. Sagedaseimad on eksonis 14 paiknev H1069Q mutatsioon kaukaasia päritolu inimestel ning eksonis 8 kodeeritav R778L mutatsioon Aasia regioonist põlvnevatel inimestel (Wallace ja Dooley, 2020). Patogeenseid mutatsioone on leitud kõigist ATP7B eksonitest peale 21. eksoni ning Euroopa populatsioonide geneetilisteks sõlmpunktideks (ingl *hotspot*) võiks Ühendkuningriigi näitel olla eksonid 2, 8 ja 14 (Kirk, 2019).

Uurimistöö kirjutamise ajaks oli leitud ATP7B geenis üle 1 000 erineva mutatsiooni Human Gene Mutation Database (HGMD) Professional järgi (vaadatud 19.07.2020). Kirjanduse kohaselt on valdav enamus neist üksiku nukleotiidi variatsiooni tüüpi (ingl *single nucleotide variation*, SNV) missenss- või nonsenssmutatsioonid (proportsionaalselt ligi 60%), sageduselt järgnevad insertioonid ja deletsioonid (26%) ning splaiss-saidi mutatsioonid (9%) (Kaler ja Packman, 2013).

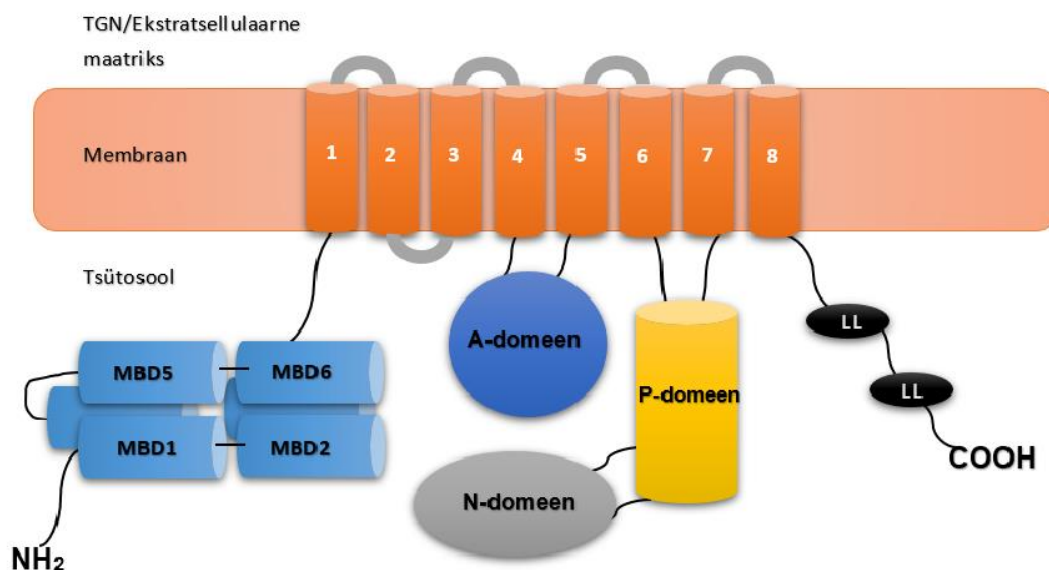
ATP7B valk sünteesitakse hepatotsüütide endoplasmaatilises retiikulumis ja viiakse sealt trans-

Golgi võrgustikku. GTEx (*Genotype-Tissue Expression*) andmebaasi (vaadatud 31.07.2020) kohaselt on ATP7B geeni ekspressiooni leitud arvestataval määral ka näiteks testises, rasvkoes, ajus, peensooles, emakas ja süljenäärmetes.

Homoloogne ATP7A geen paikneb Ensembl andmebaasi järgi Xq21.1 lookuses. Tema mutatsioonidest tingitud vase defitsiit põhjustab haigusi nagu Menkese tõbi, oksipitaalsarve sündroom (ingl *occipital horn syndrome*, OHS) ja ATP7A-seoseline distaalne motoorne neuropaatia. Neist sagedaseim on Menkese tõbi, kuid ka seda loetakse haruldaseks haiguseks (levimus on hinnatud 1:100 000-250 000 elussünni kohta). Menkese tõbi avaldub tavaliselt lastel kahe kuni kolme kuu vanuselt ja enamasti närvisüsteemi sümptomitega nagu arengupeatetus, krambihood ja hüpotoonia. ATP7A mutatsioonid OHS korral on erinevad Menkese tõvega seonduvatest, nende puhul säilib ATP7A mõningane funktsioon ning seega on OHS palju kergema fenotüübiga kui Menkese tõbi (Lorincz, 2018).

ATP7B valk sisaldab fosfataasi domeeni (A-domeen), fosforülatsiooni domeeni (P-domeen), nukleotiidi siduvat domeeni (N-domeen) ja 8 transmembraansest ioonkanalist koosnevat M-domeeni (Cater jt., 2004, 2007; Lenartowicz and Krzeptowski, 2010). Enamik patogeenseid geneetilisi muutusi on leitud N- ja M- domeenidest, eriti presümptomaatilistel või hepaatilise sümptomaatikaga patsientidel (Lee jt., 2011; Park jt., 2007). ATP7B domeenide struktuur on näidatud joonisel 1.





**Joonis 1.** ATP7B valgu domeenid ja nende paigutus rakus, Ariöz jt. (2017) järgi. MBD – *metal binding domain* (metalle siduv domeen), LL – leutsiini muster.

H1069Q mutatsioon tekib siis, kui N-domeeni SEHPL mustri histidiin asendatakse glutamiinhappega. Tulemuseks on valgu N-domeeni vale voltumine, P-domeeni ebaharilik fosforülatsoon ja ligi poole väiksem ATP sidumise võime. Lisaks on vähenenud ka ATP7B termiline stabiilsus. N-domeenis oluline muutus on veel mutatsioon E1064A, mille tagajärjel kaob täielikult valgu võime siduda ATP-d ning sellest tulenevalt on haiguse fenotüüp ka raskem (Morgan jt., 2004). Uuringud on näidanud, et nii homosügootse kui ka heterosügootse H1069Q mutatsiooniga patsientidel ilmnevad neuroloogilised sümptomid hiljem kui neil, kel see mutatsioon puudub, ning et enneaegse stopp-koodoni tõttu trunkeeritud valgud seostuvad haiguse varajase hepaatilise vormiga (Stapelbroek jt., 2004; Lorincz, 2018). Teiste levinumate patogeensete mutatsioonide hulgast võib välja tuua M875V (põhjustab valgu stabiilsuse vähenemist ja pöörduvaid ATP7B lokalisatsiooni defekte) ja G875A (valk jääb pidama endoplasmaatilisse retiikulumi) mutatsioonid (Dmitriev jt., 2011).

## 1.2 WILSONI TÕVE FENOTÜÜBI KUJUNEMINE

Kuigi genotüüp-fenotüüp seoseid on Wilsoni tõve puhul olnud keeruline tõestada, on siiski leitud, et vähemalt osaliselt säilinud ATP7B vase sidumise võime korral on tendents

mõõdukama raskusega fenotüübi poole. Küll on aga kirjeldatud juhtusid, kus sama mutatsiooniga indiviidide fenotüübid oluliselt erinevad (Dmitriev jt., 2011) ning seda ka ühe pere liikmete ja monosügootsete kaksikute korral (Czlonkowska jt., 2009; Kegley jt., 2010).

### 1.2.1 Mõjutajageenid

Potentsiaalselt võiksid Wilsoni tõve fenotüübi väljakujunemisel osaleda ka nn mõjutajageenid (ingl *modifier genes*) (Poujois jt., 2018). Neist apolipoproteiin E geenil on leitud olevat tugevaim seos Wilsoni tõvega. ApoE geenil on kolm peamist alleeli, millest sagedasem on ApoE alleel ε3. ApoE on oluline lipiidide metabolismis ning tema alleelil ε3 arvatakse olevat neuroprotektiivne toime, samas kui ε4 on seostatud erinevate neurodegeneratiivsete haigustega ning muuhulgas Wilsoni tõve varajase avaldumisega (Chen jt., 2015).

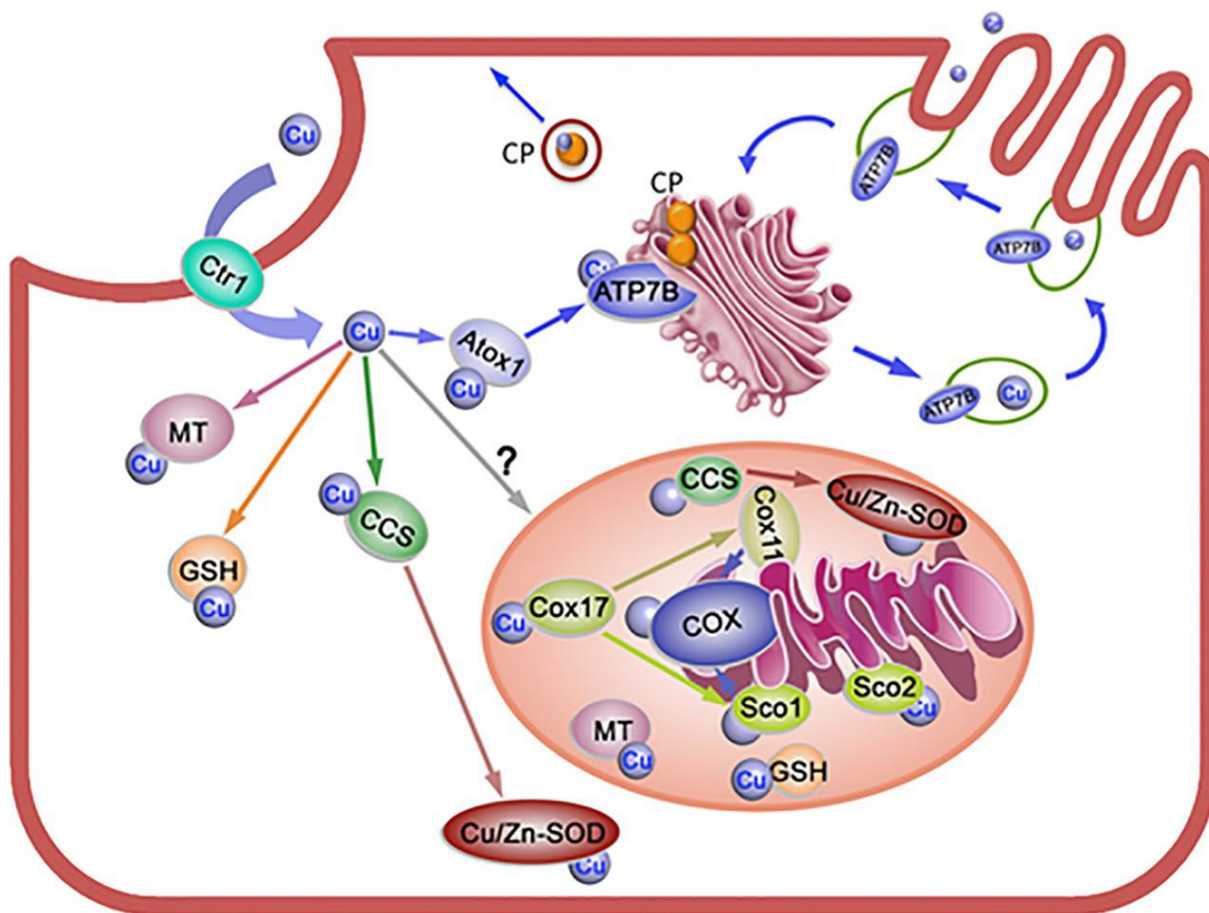
Oletatavate mõjutajageenide hulka võivad veel kuuluda ka ATOX1 (Simon, 2008), XIAP (Weiss jt., 2010), PNPLA3 ja DMT1 (Przybylkowski jt., 2014). Lisaks on Jayakanthan jt. (2017) uuringus täheldatud, et teatud ATP7B polümorfismid on sagedasemad Alzheimeri tõvega patsientidel ning et ATP7B üleekspressiooni on võimalik seostada kasvajate esinemisega. Arvatakse, et lisaks eelmainitud geenidele võib kergemale fenotübile kaasa aidata veel ATP7B mittetäielik penetrantsus (Poujois jt., 2018).

## 1.3 WILSONI TÕVE PATOFÜSIOLOOGIA

Vask on inimesele oluline mikroelement ning tal on tähtis roll normaalsetes füsioloogilistes protsessides, näiteks neurotransmitterite sünteesil, mitokondriaalses hingamisahelas ja raua metabolismis (Chen jt., 2015). Vask on oluline kofaktor mitmetes ensüümides nagu superoksiidismutaas, tsütokroom c oksüdaas, dopamiin-β-hüdroksülaas, tseruloplasmiin, lüsüüloksüdaas, diamiinoksüdaas, türosinaas ja peptidüülglütsiin alfa-amideeriv monooksüdaas (Kaler ja Packman, 2013).

Vask siseneb rakku läbi enterotsüüdi apikaalse membraani vase transporter 1 (CTR1, uuem nimetus SLC31A1) kaudu, Kaler ja Packman (2013) järgi võib rakku sisenemisel osaleda ka divalentne metallitransporter 1 (DMT1, uuem nimetus SLC11A2). Raku sees aitavad glutatioon (GSH) ja metallotioneiinid vaske koguda ja ladestada. ATP7A ülesandeks on tagada vase eritumine enterotsüüdi trans-Golgi võrgustikust vereringesse, kust see jõuab hepatotsüüti

(Lutsenko, 2014). Maks on peamine vase talletumiskoht, kust vajadusel vaske väljutatakse vereringesse, et vask jõuaks ka ülejäänud organismi rakkudeni. Joonis 2 illustreerib vase ringlust hepatotsüüdis ja ATP7B osa selles.



**Joonis 2.** Vase ringlus hepatotsüüdis. Lutsenko, 2014. Vask siseneb hepatotsüüti Ctr1 kaudu, seejärel pakitakse Atox1 valgule, mis annab vase omakorda üle ATP7B valgule. MT – metallotioneiinid, GSH – glutatioon, CP – tseruloplasmiin, Cu/Zn-SOD – Cu/Zn superoksiidismutaas, COX – tsütokroom c oksüdaas. CCS, Cox17, Cox11, Sco1 ja Sco2 on šaperonvalgud.

Hepatotsüüdis reageerib ATP7B tõusnud rakusisesele vase tasemele ning väljub Golgi võrgustikust, et vaske siduda (Guo jt., 2005). Vase šaperon, antioksidantvalk 1 (ATOX1), annab valk-valk interaktsioonide käigus vase üle ATP7B N-terminaalsele metalle siduval domeenile (Walker jt., 2004). ATP7B määrab sissetulnud vase edasise saatuse. ATP7B seob trans-Golgi võrgustikus vase aatomid apotseruloplasmiini külge, mille läbi apotseruloplasmiin aktiveerub ning muutub tseruloplasmiiniks. Tseruloplasmiin eksotsüteeritakse verre ning üleliigne vask pakitakse tsütoplasmaatilistesse vesiikulitesse, mis eritatakse organismist sapiga.

(Guo jt., 2005). Defektse ATP7B korral kuhjub vask hepatotsüüdis ning kahjustab maksakudet. Järgneda võib maksakoe nekroos, sellest johtuv vaba vase kontrollimatu paiskumine vereringesse ning ekstrahepaatiliste elundite mürgistus (Kaler ja Packman, 2013).

Kui ATP7B struktuur ja funktsioon on puudulikud, siis väheneb aktiivse tseruloplasmiini tase veres. Üleliigne kuhjuv vask osaleb Haber-Weissi reaktsioonis ning seeläbi kiirendab reaktiivsete hapniku osakeste (ingl *reactive oxygen species*, ROS) moodustumist, järgneb oksüdatiivsete DNA kahjustuste teke ning rakk võib minna apoptoosi (Chen jt., 2015). Vask hakkab kõigepealt kuhjuma maksas ning seejärel teistes organites, eelkõige ajus, põhjustades erinevaid Wilsoni tõvega seostatud sümptomeid (Lorincz, 2018).

Homosügootsetel ATP7B +/- hiirtel tehtud katsed viitavad ka muutustele mRNA üldises profiilis haiguse eri staadiumites. Selle foonil algab varajane vase kuhjumine tsütosoolis (seotuna metallotioneiinidega) ja rakutuumas (vabas olekus). Haiguse progresseerudes on ülesreguleeritud lüsosomaalsete ja endosomaalsete valkudega seotud mRNA ning vase kuhjumine suunatakse pigem membraansetesse rakustruktuuridesse. Seega võivad nii mRNA kui ka vase kuhjumise asukoht rakus anda informatsiooni haiguse kulust (Huster jt., 2006).

## 1.4 WILSONI TÕVE AVALDUMINE

Wilsoni tõve avaldumise vanus võib olla patsientide vahel väga erinev, aga tavaliselt jääb 6. ja 40. eluaasta vahele (Theise, 2015). Wilsoni tõve sümptomaatika võib hõlmata mitmeid elundkondi; tihti esineb neuroloogilisi, psühhiaatrilisi, oftalmoloogilisi või hepaatilisi sümptomeid.

### 1.4.1 Neuroloogilised ja oftalmoloogilised häired

Lorincz (2018) järgi esinevad Wilsoni tõve neuroloogilise vormi korral kõige sagedamini düsartria, düstoonia, kõnnaku häired ja lihasvärinad (parkinsonism). Alguses on sümptomid sageli isoleeritud. Haiguse hilisemas faasis võivad lisanduda müokloonus, krambihood, püramidaalnähud, silma anomaalsed liigutused, ataksia, korea ja muud sundliigutused (Walshe ja Yealland, 1992).

Kognitiivsed häired on üldiselt tagaplaanil, nendest esineb peamiselt otsmikusagara sündroom ja subkortikaalne dementsus. Oftalmoloogiliselt on olulisim pruunikas, vase ladestumisest tingitud Kayser-Fleischeri ring silma sarvkestas, mis esineb peaaegu 100% Wilsoni tõve neuroloogilise vormi juhtudest ning hepaatilise ja presümptomaatilise vormi puhul umbes 50% juhtudest (Lorincz, 2018).

#### 1.4.2 Psühhiaatrilised häired

Hinnanguliselt 30-50% patsientidest ilmnevad esimesena psühhiaatrilised sümptomid. Sagedaseimad on muutused iseloomus ja käitumises, depressioon, ärrituvus (Lorincz, 2018). Täheldatud on ka erinevaid foobiaid ning kompulsivset käitumist (Theise, 2015). Paraku jäävad nii psühhiaatrilised kui ka neuroloogilised sümptomid sageli liiga üldiseks, et nende põhjal üksi Wilsoni tõve diagnoosi kahtlustada.

#### 1.4.3 Maksakahjustused

Peamisteks kroonilisteks maksahaigusteks peetakse viirushepatiite, mittealkohoolse rasvmaksa tõbe (ingl *non-alcoholic fatty liver disease*, lühend NAFLD), alkohoolset maksahaigust ja hepatotsellulaarset kartsinoomi. Maksakahjustusi esineb sekundaarselt ka südamepuudulikkuse, vähi või ekstrahepaatiliste infektsioonide korral (Theise, 2015). NAFLD avaldub Wilsoni tõvele väga sarnaselt - mõlemad iseloomustab steatoos, põletik ja rakusurm. NAFLD võib edasi progresseeruda mittealkohoolseks steatohepatiidiks ning viimase aja andmete kohaselt võib see üleminek olla seotud just tasakaalustamata üleliigse vasega (Gerosa jt., 2019).

Maksakahjustus on varaseim ning sagedaseim Wilsoni tõve sümptom (Czlonkowska jt., 2018). Wilsoni tõve hepaatiliste vormide seas võib eristada ägedat hepatiiti, kroonilist aktiivset hepatiiti, maksatsirroosi ja ägedat fulminantset maksapuudulikkust. Ägeda maksanekroosiga kaasneb sekundaarne hemolüüs ning ikterus. Hemolüüsi koosinemine maksahaigusega on tugev argument Wilsoni tõve kahtluseks (Lorincz, 2018), hemolüütiline aneemia võib olla tingitud vaba vase otsesest toksilisusest erütrotsüütide membraanidele (Theise, 2015).

#### 1.4.4 Muud sümptomid

Wilsoni tõbi võib hõlmata ka neerusid, väljendudes näiteks Fanconi sündroomi või neerukivide

kujul. Lisaks võib esineda osteoporoosi või osteomalaatsiat ning artralgiad. Naistel kaasneb sageli ka düsmenorröa. Kardiovaskulaarsetest sümptomitest võib täheldada müokardi interstitsiaalset fibroosi ja müokardiiti, ortostaatilist hüpertensiooni. Harvem ilmnevad paratüreoidism, pankrease puudulikkus või naha anomaaliad (Lorincz, 2018).

#### 1.4.5 Wilsoni tõvele viitavad histoloogilised leiud

Wilsoni tõve patsientidelt võetud maksabiopsiate histoloogiline pilt võib sageli sarnaneda nii alkohoolse kui ka mittealkohoolse rasvmaksa omaga (Pronicki, 2017). Biopsiatel täheldatakse iseloomulikku peroksüsoomide arvu suurenemist ja lipolüüsosüümide esinemist, millega kaasnevad suured mitokondriaalsed muutused. Lisaks ilmnevad nn glükogeen-tuumad (ingl *glycogen nuclei*), mis tekivad karioplasma ja glükogeeni inklusioonide segunemisel või tsütoplasmas leitavad rasvatilgad, mis viitavad lipiidide ainevahetuse häiritusele. Vabast vasest tingitud oksüdatiivne stress mõjub esimesena mitokondritele ning nende membraanid lagunevad (Gerosa jt., 2019).

Mitokondriaalsed muutused on tavapäraselt esimesteks patoloogilisteks leidudeks Wilsoni tõve patsientide maksarakkudes (Gerosa jt., 2019). Võib arvata, et mitokondrite hävimise järel tõuseb ROS tase rakus veelgi, mis nii-öelda teise lainena kahjustab maksa või teisi organeid.

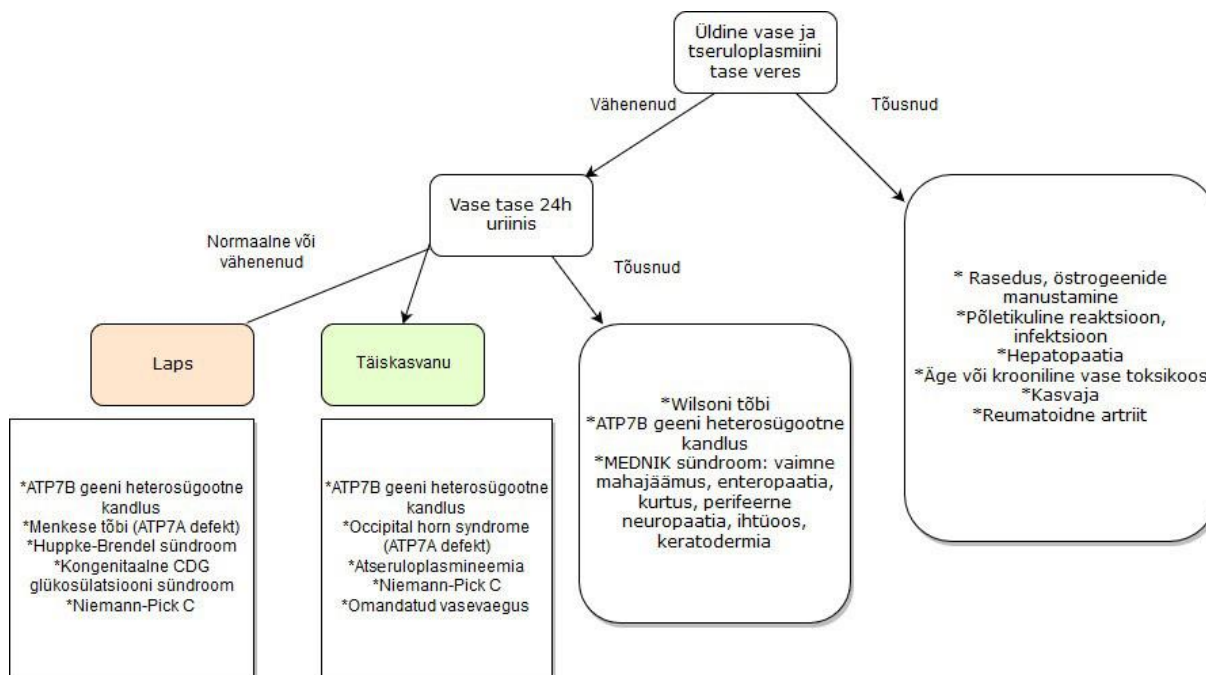
Tänapäeval peetakse Wilsoni tõvele omasteks histoloogilisteks leidudeks Mallory-Denk'i kehakesi, lipogranuloome, steatoosi ja glükogeenseid tuumasid, millest viimast kahte võib näha ka juba haiguse algfaasis. Gerosa jt. (2019) lisab veel, et maksa histoloogia Wilsoni tõve patsientidel ei näita ühest mustrit, vaid pigem mitut, mis osaliselt kattuvad nii alkohoolse hepatiidi, NAFLD kui ka viirushepatiidiga.

### 1.5 WILSONI TÕVE DIAGNOOSIMINE

Patsiendi kliiniline pilt ja perekondlik anamnees on harilikult esimesteks suunisteks Wilsoni tõve diagnoosimisel, suure tähtsusega on kliinilised uuringud, biokeemilised ja geneetilised analüüsid.

#### 1.5.1 Biokeemilised analüüsid

Biokeemilistest analüüsides on olulisel kohal vase ja tseruloplasmiini kontsentratsiooni määramine verest ja uriinist (diferentsiaaldiagnoosi skeem joonisel 3). Iseäranis tuuakse välja 24 tunni uriini vase erituse testi, kus sümptomaatilistel Wilsoni tõve patsientidel on eritativ vase tase alati normaalsest kõrgem – vähemalt 100 mikrogrammi 24 tunni kohta (Brewer jt., 2001; Czlonkowska jt., 2018).



**Joonis 3.** Vere ja uriini vase taseme düsbalansi potentsiaalsed põhjused, Poujois jt. (2018) järgi.

Biokeemilistes analüüsides on tseruloplasmiini kõrval oluline maksaensüümide taseme määramine verest, kuid Lorinczi (2018) järgi võib ligi 10% Wilsoni tõve patsientidest olla vere tseruloplasmiini väärtus terve isiku tasemel või sellele ligilähedane. Langenud tseruloplasmiini tase veres koos normaalse või kergelt tõusnud vase tasemega veres viitab Wilsoni tõvele, kuna vase taset kompenseerib tseruloplasmiiniga seondumata vaba vase kontsentratsioon veres (Czlonkowska jt., 2018). Siinkohal on oluline silmas pidada ka võimalikku erisust Wilsoni tõve neuroloogilise ja maksavormi vahel, nagu seda illustreerib Steindl jt. (1997) uurimus, mille kohaselt leiti madal tseruloplasmiini tase umbes 85% neuroloogilise Wilsoni tõve patsientidest, aga ainult 65% maksahaigusega patsientidest.

Viimastel aastatel on esile tõstetud ka veel vähe tuntud suhtelise ülekantava vase (ingl *Relative Exchangeable Copper*, REC) fraktsiooni arvutamist, mis näitab labiilse CuEXC (albumiini ja teiste peptiididega seotud ülekantava vase kontsentratsiooni) suhet kogu vere vase sisaldusse

(Guillaud jt., 2017; Woimant jt., 2019). REC väärtuse eeliseks diagnostilise markerina on tema arvutamise lihtne teostus ning väga kõrge spetsiifilisus ja tundlikkus (Poujois jt., 2018; Schmitt jt., 2013).

### 1.5.2 Kliinilised uuringud

Kliinilistest uuringutest on olulisel kohal Kayser-Fleischeri ringide määramine silmade läbivaatusel pilu-lambiga ja perkutaanne maksabiopsia. Perkutaanne maksabiopsia on meetod, mille kaudu on võimalik koguda materjali maksa histoloogiliseks uuringuks ning seeläbi määrata vase kontsentratsiooni maksas. Wilsoni tõve geenivariantide heterosügootsetel kandjatel on samuti täheldatud tõusnud vase sisaldust maksas võrreldes tervete isikutega, aga Wilsoni tõve diagnoosi lävendiks peetakse vähemalt 200 µg vaske maksa kuivmassi grammi kohta, mis on ligi 4 korda kõrgem normaalsest tasemest (Lorincz, 2018). Tegemist on küll usaldusväärse, kuid invasiivse meetodiga, mistõttu see analüüs pole esmavalikus ning kasutatakse juhul, kui kliinilistest sümptomitest ja mitteinvasiivsetest testidest ei piisa või kui kahtlustatakse lisaks mõnda muud maksahaigust (Czlonkowska jt., 2018). Magnetresonantstomograafia (MRT) uuringud on olnud samuti abiks diagnoosi määramisel, tuvastades potentsiaalselt Wilsoni tõvest tingitud ajukahjustusi, mis ilmnevad sagedamini neuroloogiliste või psühhiaatriliste sümptomitega patsientidel (Lorincz, 2018).

### 1.5.3 Geneetilised analüüsid

Geneetilist analüüsi peetakse Wilsoni tõve diagnoosimisel kuldstandardiks (Guillaud jt., 2017; Chang ja Hahn, 2017). Järgmise põlvkonna sekveneerimine (ingl *next generation sequencing*, NGS) on tänapäeval tõhusaim meetod suurte geenide uurimiseks, kuna on hüpoteesivaba, kiirem ja informatiivsem kui Sangeri sekveneerimine (Poujois jt., 2018). Jätkuvalt on siiski Sangeri sekveneerimine üks olulisemaid tööriistu geneetiliste analüüside läbiviimiseks Wilsoni tõve kahtluse korral (Coffey jt., 2013; Stättermayer jt., 2019). Bost jt. (2012) toob välja ka ligeerimis-sõltuvate proovide hulgiamplifitseerimise ehk MLPA testi (ingl *multiplex ligand-dependant probe amplification*) kasutamise võimaluse, kui on tuvastatud ainult üks patogeenne mutatsioon, aga patsiendi kliiniline pilt viitab tugevalt Wilsoni tõvele. Geneetiliste analüüside kasutamine võib oluliselt vähendada vajadust invasiivsemate meetodite järele.



### 1.5.4 Diagnoosi defineerimine

Wilsoni tõve diagnoosi osas on raske määrata rangeid kriteeriume. Näiteks Poujois jt. (2018) peab Wilsoni tõve klassikaliseks triaadiks üldist hüpokupreemiat, hüpotseruloplasmineemiat ja hüperkupuuriat. Lorincz (2018) järgi oleksid diagnoosi kriteeriumid klassikaline kliiniline pilt, hüperkupuuria ja Kayser-Fleischeri ringide esinemine.

Kuigi Wilsoni tõbe kirjeldatakse ametlikult kui autosoom-retsessiivset haigust, siis viitavad hiljutised uuringud ka pseudodominantse pärandumise võimalusele (Chang ja Hahn, 2017). Poujois jt. (2018) hinnangul võiks umbes 2% Prantsusmaa Wilsoni tõve haigetest olla heterosügootid, kellel on ainult üks ATP7B mutatsioon või siis kellel ei leita ühtegi ATP7B mutatsiooni. Espinos ja Ferenci (2020) kohaselt oleks otstarbekas suunata sõeluuringule indekspatsiendi asümptomaatilisi õdesid-vendi ning Poujois jt. (2018) soovitab sama indekspatsiendi lähisugulaste (õed-vennad, lapsed jne.) ringis.

### 1.5.5 Pseudodominantsus ja heterosügootne fenotüüp

Coffey jt. (2013) ning Loudianos jt. (2016) esitatud Wilsoni tõve perekondlikud analüüsid osutavad samuti haiguse pseudodominantse pärandumise võimalusele. Loudianos jt. (2016) kohaselt tuleks Wilsoni tõve patsientide sugulastele, kellel esineb minimaalseid kõikumisi vasega seotud näitajates või näiteks steatoosi, teha geneetiline analüüs kogu ATP7B geeni ulatuses, et välistada Wilsoni tõbi.

Skowronska jt. 2020. aasta artikkel kirjeldab transkraniaalset ultraheliuuringut (ingl *transcranial sonography*) Wilsoni tõve kahtlusega patsientidel, kus leiti, et heterosügootidel esines statistiliselt oluliselt rohkem ( $p < 0.001$ ) bilateraalsel läätstuuma (ld *nucleus lentiformis*) hüperrehhogeensust, mida ei tuvastatud ühelgi kontrollgrupi liikmel. Läätsuuma bilateraalse hüperrehhogeense piirkonna pindala oli suurim H1069Q mutatsiooniga indiviididel. Märkimisväärne oli veel, et kõigil uuringus osalenud heterosügootidel oli 24 tunni vase eritus uriiniga normaalsel tasemel.

## 1.6 WILSONI TÕVE RAVI

Wilsoni tõbi kuulub väheste haruldaste geneetiliste haiguste hulka, mida on võimalik raviga täielikult kontrolli alla saada, kuid ravi on eluaegne. Raviainetena kasutatakse näiteks vase kelaatoreid (D-penitsillamiin, trietüleentetraamiin) või tsingisoolasid (näiteks tsinkatsetaat). Vase kelaatorid toimivad vase eritust uriinis suurendavalt ja tsingisoolad vastavalt vähendades vase imendumist sooles (Poujois jt., 2018). D-penitsillamiini ja trietüleentetraamiini tarvitamisel võib esineda olulisi kõrvaltoimeid, sealhulgas neuroloogilisi. Tsinkatsetaati on edukalt kasutatud nii algusstaadiumis neuroloogilise Wilsoni tõve vormi ravis kui ka ennetava ravina presümptomaatilistel patsientidel, kuid enne ravi alustamist on vajalik juba kuhjunud vase eritus organismist teiste meetoditega (Lorincz, 2018). Guillaud jt. (2014) pikaajalise uuringu näitel võiks hepaatilise Wilsoni tõve vormiga ägeda või kroonilise maksapuudulikkusega patsientidel haiguse prognoosi parandada ka maksa siirdamine.

Wilsoni tõve ravimata jätmisel või hilinenud ravi tulemusena võib naistel välja kujuneda viljatus või esineda raseduse katkemisi, ühe teooria kohaselt põhjustab viljakuse langust vase ladestumine emakas, mis simuleerib vasest üsisisese rasedumisvastase vahendi toimet (Mustafa ja Sharmina, 1998). Reuner ja Dingeri 2019. aastal teostatud uurimus näitas, et kuigi Wilsoni tõve diagnoosiga ja raviga jätkavatel rasedatel esines sageli rasedusaegseid komplikatsioone, siis lapsed sündisid elusate ja tervetena. Võttes arvesse eelnevaid näiteid ning fakti, et Wilsoni tõbi ilmneb harilikult varajases täiskasvanueas, võib järeldada, et õigeaegne diagnoos ja ravi aitavad muuhulgas kaasa naispatsientidel raseduste edukale kulule.

Collet jt. (2018) järgi raskendavad Wilsoni tõve diagnoosimist varieeruv penetrantsus ning eelkirjeldatud mitmekesine fenotüüp, kuid artiklis rõhutatakse ka, et ravimata jäänud Wilsoni tõbi lõpeb harilikult letaalselt. Nii Collet jt. (2018) kui ka Lorincz (2018) toovad välja, et just Wilsoni tõve ravitavuse tõttu on oluline haiguse varajane diagnoos. Usaldusväärseid molekulaarseid teste oleks Wilsoni tõve diagnoosimisel tarvis mitte ainult invasiivsemate meetodite vältimiseks, vaid ka ebakorreksete diagnooside vähendamiseks, sest väärade ravi määramisel võivad patsiendil organismis välja areneda mitmesugused hematoloogilised ja neuroloogilised kahjustused (Kumar jt., 2004).

## 1.7 ATP7B VARIANTIDE RAPORTEERIMINE TAGASISIDES

Ameerika Ühendriikide meditsiinigeneetika kolleegium (ingl *American College of Medical Genetics*, ACMG) avaldas 2013. aastal nimekirja geenidest, mille alusel tuleks haigusseoselised leiud neis geneetilise tagasiside andmisel patsiendile soovituslikult raporteerida juhuleidudena (ingl *reportable secondary findings*), kui need ei olnud geneetilise analüüsi esmaseks sihtmärgiks. 2016. aastal lisati sellesse nimekirja ka ATP7B geen (Kalia jt., 2017).

Nimekirja lisatakse piisavalt kõrge penetrantsusega geenid, mille leidude raporteerimisega seotud sekumine võiks oluliselt tõsta patsiendi elukvaliteeti ja -iga. ATP7B geeni soovitatakse ACMG järgi raporteerida juhuleidude hulgas, kui tegemist on leiuga, kus on olemas kaks teadaolevalt patogeenset (ingl *known pathogenic*) või eeldatavalt patogeenset (ingl *expected pathogenic*) alleeli. ACMG juhiste kohaselt piisab asümptomaatilistel patsientidel ATP7B leiu kinnitamiseks Sangeri sekveneerimisest, kusjuures tuleks raporteerida sekundaarse leiuna ka liitheterosügootide juhud, kus on *trans*-asendis vähemalt üks teadaolevalt patogeenne variant. Sümptomaatilistel patsientidel soovitatakse diagnostilisel eesmärgil lisaks mõõta tseruloplasmiini taset ja vase kontsentratsiooni veres ning vajadusel ka vase eritust uriiniga (Kalia jt., 2017). Diagnoosimisel ning patsiendi prognoosi hindamisel võib olla abi ka diagnostiliste skooride nagu UWDRS (ingl *Unified Wilson's Disease Rating Scale*) kasutamisest (Volpert jt., 2017).

### 1.7.1 Kliiniliselt oluliste variantide andmebaasid

ClinVar on avalik *National Institute of Health* (NIH) hallatav andmebaas, kuhu on koondatud ligi 842 000 raporteeritud geneetilist varianti ja nende haigusseoselisuse tõlgendused. Andmebaasis loetletud patogeensuse interpretatsioonid pärinevad ülemaailmselt nii kliinilistest laboritest kui ka teaduslikest uurimisgruppidest. ClinVar omistab variantidele nn ülevaate staatuse (ingl *review status*), mis võtab kokku variandi raportite hetkeseisu ja konsensuse (Landrum jt., 2017).

WilsonGen on CSIR *Institute of Genomics and Integrative Biology* teadlaste poolt ACMG ja AMP (*Association of Molecular Pathologists*) patogeensuse määramise juhendi järgi (Richards jt., 2015) koostatud kureeritud andmebaas Wilsoni tõve alleelidest ja nende patogeensusest erinevate allikate (sh ClinVar ja üle 600 teadusartikli) järgi. Variantidele omistati patogeensuse

tase ACMG liigituse järgi, võttes arvesse muuhulgas mutatsiooni liiki ja tagajärge ning varem kirjeldatud funktsionaalseid katseid (Kumar jt., 2020).

### 1.7.2 *In silico* meetodid patogeensuse hindamisel

*In silico* meetodite kasutamine on üks ACMG ja AMP juhendi kriteeriumitest variandi patogeensuse määramisel. *In silico* meetodid rakendavad algoritme, mis võimaldavad hinnata toimunud mutatsiooni mõju nukleotiidi, aminohappe või valgu tasemel (Richards jt., 2015). Missenss-mutatsioonide, mis on ühed sagedaseimad mutatsioonid ATP7B geenis, puhul on *in silico* algoritmide täpsus hinnaguliselt 65-80% teadaolevate haigusseoselist variantide analüüsimisel (Thusberg jt., 2011). *In silico* meetodid ei tohiks olla ainsaks argumentiks variandi patogeenseks tunnistamisel (Richards jt., 2015), aga nad pakuvad lisaväärtust otsuse tegemisel koos fenotüübi andmete ning kirjandusega.

Antud töös otsustati kasutada CADD ja METALR, mis olid Ghosh jt. (2017) ning Li jt. (2018) järgi ka ühed võimekamatest algoritmidest analüüsima muuhulgas ClinVar andmebaasi variante. CADD ning METALR skoor on mõlemad kompleksalgoritmid (ingl *ensemble predictors*), mis ühendavad endas mitmeid vanemaid algoritme (Ghosh jt., 2017). Erinevalt METALR-st võtab CADD arvesse ka variandi metülatsiooni taset, GC sisaldust ja referentsalleeli (Dong jt., 2015). Ghosh jt. (2017) näitas veel, et enim kasutatavad algoritmid olid omavahel paremini kooskõlas, kui nende hulgas oli METASVM või METALR skoor.

CADD (*Combined Annotation-Dependant Depletion*) ehk C-skoor on algoritm, mille tagastatav väärtus korreleerub analüüsitava variandi funktsionaalsuse, patogeensuse, põhjustatava haiguse raskuse ning eksperimendi korras vaadeldud reguleerivate mõjudega. CADD kõrvutab fikseerunud ning simuleeritud variandid, leidmaks kahjulikke variante, mis vähendavad organismi fitnessi. CADD on suuteline analüüsima nii SNV kui ka lühikesi indeleide (Kircher jt., 2014).

METALR algoritm on üles ehitatud logistilisele regressioonile ning kätkeb endas 9 erineva variandi kahjulikkust määravat skoori (FATHMM, GERP++, LRT, Mutation Assessor, MutationTester, PolyPhen-2, PhyloP, SIFT ja SiPhy) ja alleelisageduse informatsiooni. Nende näitajate alusel omistab METALR variandile tema võimalikku patogeensust tähistava väärtuse (Dong jt., 2015).

Peale CADD ja METALR kasutati antud töös ka Ensembli andmebaasi IMPACT skoori, mis hindab toimunud mutatsiooni raskuse kas HIGH (kõrge), MODERATE (keskmine), LOW (madal) või MODIFIER (mõjutav) väärtuseks. Väärtustele vastavad mutatsiooni tüübid on kättesaadavad Ensembli andmebaasi kodulehe *Calculated consequences* sektsioonist.

## 2. UURIMUS

### 2.1 TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö eesmärgiks on koostada kaasajastatud eestikeelne kokkuvõte Wilsoni tõbe käsitleva teaduskirjanduse põhjal, mis võiks olla alusmaterjaliks seda haigust käsitleva pilootprojekti planeerimisel, lisaks tuvastada Eesti rahvastikku esindava Eesti Geenivaramu biopanga kohordi andmete põhjal võimalikud patogeensed ATP7B geeni variandid ning võimalusel määrata hinnanguliselt, kas Geenivaramu fenotüübiandmestik on rakendatav Wilsoni tõve uurimiseks Eestis. Antud töö on eeltöö ATP7B geeni puudutava geneetilise tagasiside raporti jaoks Eesti Geenivaramus.

### 2.2 MATERJAL JA METOODIKA

#### 2.2.1 Valim

Eesti Geenivaramu (EGV) biopangas on tänase seisuga uurimistöös kasutamiseks korrastatud 199 161 geenidoonori andmed. Neist 162 727 kohta oli käesoleva töö tegemisel olemas fenotüüpi kirjeldavaid andmeid ning 152 357 kohta olid kättesaadavad EGV protokollide järgi kvaliteedikontrolli läbinud ja annoteeritud genotüpiseerimisandmed analüüsist ülegenoomse mikrokiibiga (Illumina GSA mikrokiip). Täiendavalt oli 4 776 isiku kohta võimalik kasutada väljavõtet NGS andmetest (täisgenoomi või eksoomi sekveneerimisandmed uuritavat geeni katva ala ulatuses).

#### 2.2.2 Genotüpiseerimine, imputeerimine ja sekveneerimine Eesti Geenivaramus

Uurimistöös kasutatud genotüpiseerimise andmed saadi Eesti Geenivaramu tuumiklabori teadlastelt, kes kasutasid genotüpiseerimiseks GSA (*Illumina Infinium Global Screening Array BeadChip*) geenikiipi (Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Imputeeritud geenandmed saadi samuti Eesti Geenivaramu teadlastelt, kes viisid imputeerimise läbi lähtudes EGV referentsgenoomist.

Uurimistöös kasutati lisaks Broad Instituudis (Cambridge, MA, USA) sekveneeritud 2 284

täisgenoomi ning Nestlé Terviseteaduste Instituudis (Lausanne, Šveits) *Agilent SureSelect Human All Exon V5+UTRs* kitiga sekveneeritud 2 500 täiseksoomi andmeid. Kõik andmed on joondatud GRCh37 (*Genome Reference Consortium Human Build 37*) järgi.

### 2.2.3 Töö käik

Koondandmed genotüpiseerimiselt, sekveneerimiselt ja imputeerimiselt uuritava geeni ATP7B ala katvas ulatuses suunati kokku ühte Exceli faili. Huvipakkuv genoomne ala oli defineeritud GRCh37 järgi kui chr13:52499572-52591261. Kokku oli nimetatud 3 allika koondandmete hulgas 2 550 leidu, millest omakorda 1 563 olid unikaalsed. Saadud andmetele lisati variantide positsiooniline kattuvus ATP7B regulatoorsete elementidega (ingl *regulatory build*) nagu võimendajad (ingl *enhancers*), promootoriga külgnevad alad (ingl *promotor flanking regions*) ja promootoralad (ingl *promotor*). Nende elementide koordinaadid saadi Ensembl andmebaasist 25.06.2020 seisuga. SNP-nexuse veebilehte (Dayem Ullah jt., 2013) kasutati koordinaatide teisendamiseks GRCh37 ja GRCh38 vahel. Edasi toimus andmete sorteerimine kahe eri meetoodika alusel (töövoog on kujutatud joonisel 4).

Esimese meetoodika puhul kasutati järgmisi kriteeriume:

1. IMPACT skoor – MODERATE või HIGH
2. Alleelisagedus võrdne või madalam kui 1%
3. Variant kuulub ATP7B geeni alasse
4. Variandile kehtib vähemalt üks kahest siinnimetatud tingimusest – kas CADD skoor võrdne või suurem kui 10 ning METALR skoori hinnang on kahjustav (ingl *deleterious*) (D) või on varianti ClinVari andmebaasis kirjeldatud kui patogeenset (ingl *pathogenic*) või tõenäoliselt patogeenset varianti (ingl *likely pathogenic*).

Sellise filtreerimise tulemusena saadi 152 leidu, millest 97 olid unikaalsed.

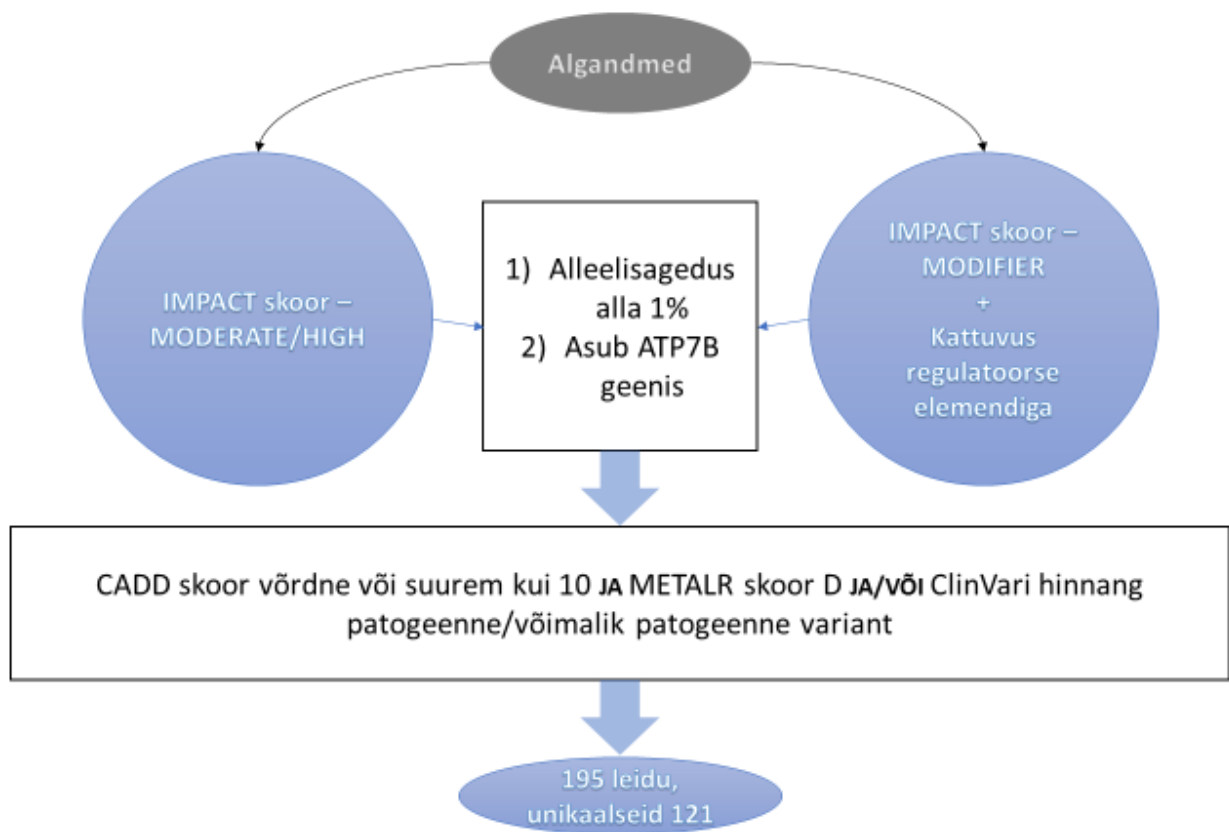
Teise meetoodika alusel rakendati kriteeriume alljärgneva algoritmi vormis:

1. IMPACT skoor – MODIFIER
2. Variant kattub ATP7B regulatoorse elemendiga
3. Alleelisagedus võrdne või madalam kui 1%

4. Variant kuulub ATP7B geeni alasse
5. Variandile kehtib vähemalt üks kahest siinnimetatud tingimusest – kas CADD skoor võrdne või suurem kui 10 ning METALR skoori hinnang on kahjustav\* (ingl *deleterious*) (D) või on varianti ClinVar andmebaasis kirjeldatud kui patogeenset (ingl *pathogenic*) või tõenäoliselt patogeenset varianti (ingl *likely pathogenic*).

\*Kuna tegemist oli peamiselt mittekodeerivate variantidega, siis võeti siin arvesse ka need variandid, millel METALR skoor puudus, aga mis vastasid kõigile teistele nõuetele.

Sellise filtreerimise tulemusena saadi 43 leidu, millest 24 olid unikaalsed.

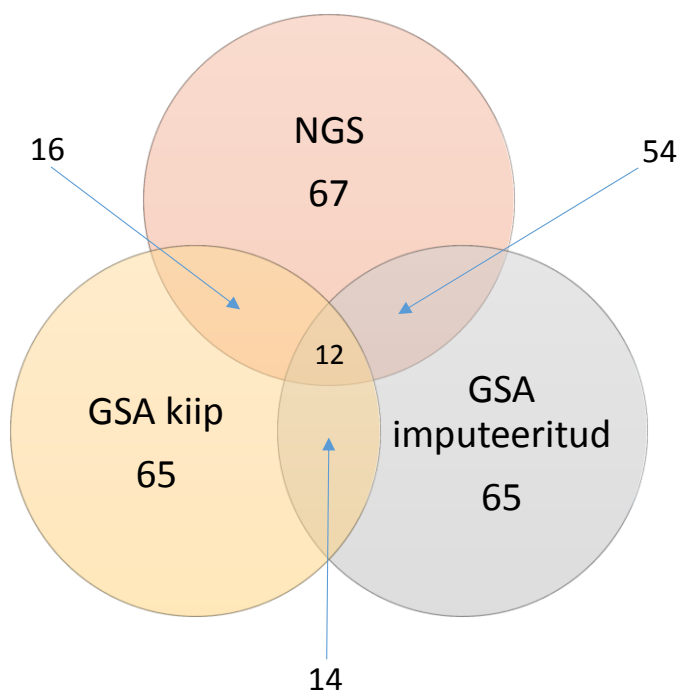


**Joonis 4.** Leidude filtreerimise töövoog.

Kahe metoodika tulemusena saadud leidudest variantide kogumile otsustati lisada veel variant rs1312634432 (c.-3368\_-3393delTGCCAGCCTCATTGAGGTGACTGGCCG), kuna selle IMPACT skoor oli HIGH, alleelisagedus oli alla 1%, variant kuulus ATP7B geeni alasse, asukoht kattus reguleeriva elemendiga ning tegemist oli indeliga. Seega lõpptulemuseks vastas



seatud kriteeriumitele 195+2 leidu, millest 121+1 olid unikaalsed. 197 leiu hulgas kokku oli omakorda 65 geenikiibilt otse määratavat leidu, 65 imputeeritud leidu ja 67 sekveneeritud leidu (joonis 5).



**Joonis 5.** Filtreerimise tulemuste jaotus andmete päritolu järgi.

Seejärel järgnes käsitsi leidude sorteerimine, mille tulemusena 197 leiu hulgast omakorda eemaldati 31 leidu järgnevate lisakriteeriumitega :

- Leiu näol oli tegemist null-imputatsiooni reaga
- Tegemist oli variandiga, mida esines kõrgel määral (MAF (ingl *minor allele frequency*) üle 0.0054) mõnes kontrollpopulatsioonis
- Funktsionaalne uuring on tõendanud variandi kahjutust
- WilsonGen ja/või ClinVar hinnangul oli variant tõenäoliselt healoomuline (*likely benign*)

#### 2.2.3.1 Variantide klassifitseerimine

ACMG ja AMP 2015. aasta juhend jaotab variandid kõige kõrgemast patogeensuse tasemest madalaimani 5 erinevasse klassi: *pathogenic*, *likely pathogenic*, *uncertain significance*, *likely*

*benign*, *benign. Uncertain significance* klassi liigitatakse need variandid, mille raportid on vastukäivad või ei vasta juhendile. Juhend kehtib ainult mendeliaalsete haiguste puhul, millel on suhteliselt kõrge penetrantsus (Strande jt., 2018); Wilsoni tõbi vastab neile nõuetele (Kalia jt., 2017). Klassifikatsioonil võetakse arvesse erineva tugevusega argumente, mis tulenevad variandi päritolupopulatsiooni, alleelide ja nende kosegregatsiooni andmetest, bioinformaatilistest ja ennustuslikest andmetest ning funktsionaalsetest uuringutest nagu on näha tabelis 1, kuhu on märgitud ka vastavad kriteeriumi koodid.

**Tabel 1.** Variandi patogeensus argumendi alusel, Strande jt. (2018) järgi.

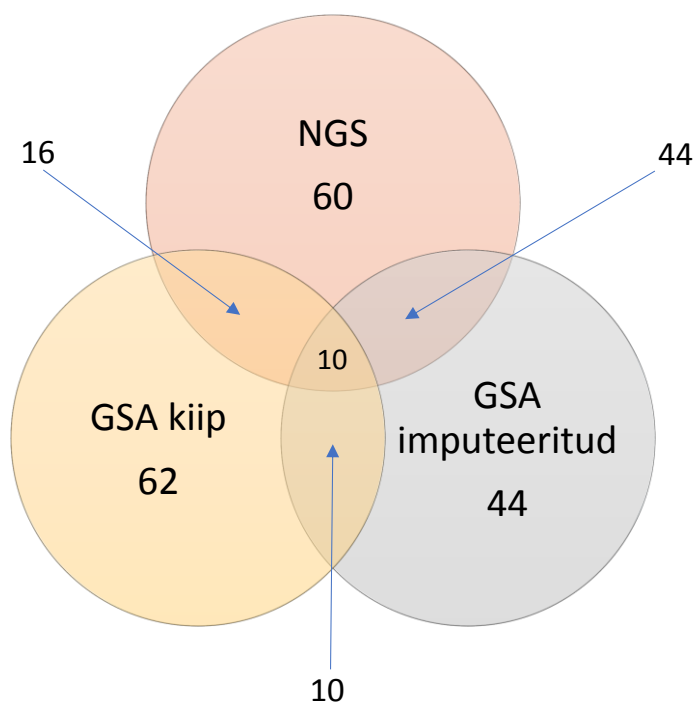
		Kahjutu (ingl <i>benign</i> ) variandi kriteeriumite tasemed		Patogeense variandi kriteeriumite tasemed			
Argumendi tugevus		Tugev	Toetav	Toetav	Mõõdukas	Tugev	Väga tugev
Argumendi kategooria ja vastavad ACMG/AMP koodid	Populatsiooni andmed	BS1 BS2			PM2	PS4	
	Alleelide ja kosegregatsiooni andmed	BS4	BP2 BP5	PP1	PP1 PM3 PM6	PP1 PS2	
	Bioinformaatilised ja ennustuslikud andmed		BP1 BP3 BP4 BP7	PP2 PP3	PM1 PM4 PM5	PS1	PVS1
	Funktsionaalsed andmed	BS3				PS3	
	Muu		BP6	PP4 PP5			

Lisas 1 on koodidele vastavad kriteeriumid lahti kirjutatud ning lisas 2 on näha algoritm, mille alusel variante klassifitseeritakse koodide järgi. Kuna varasema filtreerimisega on põhimõtteliselt välditud *benign* ehk B-koodide kriteeriume, siis on lisas 1 välja toodud ainult patogeensususe poolt olevad argumendid. Antud töös kasutati kriteeriumite hindamiseks ClinVar

andmebaasi hinnanguid, Ensembli andmebaasi, funktsionaalsete domeenide asukohti Squitti jt. (2014) artikli järgi, ennustuslikke *in silico* kompleksalgoritme CADD ja METALR ning IMPACT skoori.

## 2.3 TULEMUSED JA ARUTELU

Automaatse ja käsitsi sorteerimise tulemuseks oli 166 leidu (unikaalseid 106), millest 60 saadi NGSi andmestikest, 62 GSA geenikiibi andmestikest ning 44 imputatsiooni andmestikest. Joonis 6 illustreerib vastavat jaotust analoogselt joonis 5-le. Kahte joonist omavahel võrreldes on näha, et vaatamata nii GSA kiibi kui ka NGSi leidude koguarvu vähenemisele on jäänud nende ühiste leidude arv samaks ning imputeeritud leidudest on järele jäänud vaid need, millel on olemas ka vastav NGS leid. Sellest võib järeldada, et pärast nii automaatset kui ka käsitsi sorteerimist allesjäänud leiud on usaldusväärsemad, kuna järele on jäänud peamiselt need, millel on erinevate tehnoloogiatega kaetud kvaliteetsed tulemid.

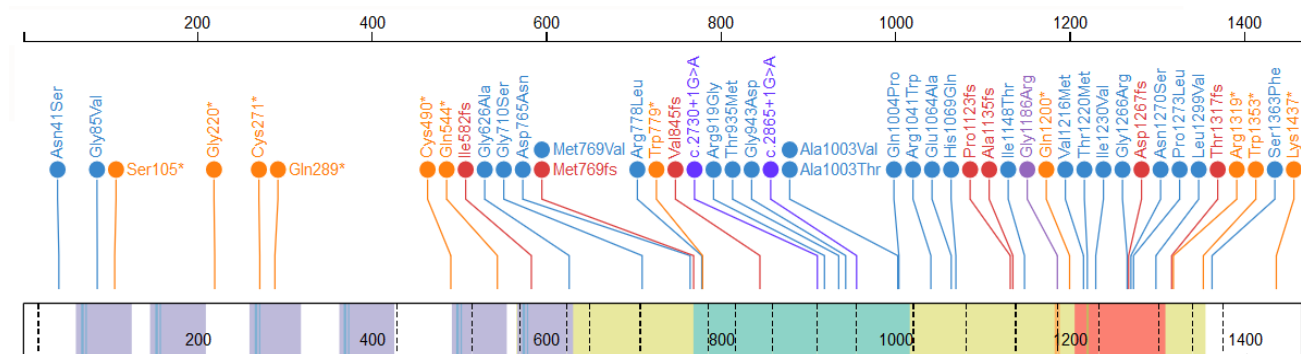


**Joonis 6.** Leidude lõplik jaotus andmete päritolu järgi pärast automaatset ja käsitsi sorteerimist.

Nende 166 leiu hulgas oli veel 14, mis ei kuulunud klassifitseerimisele, aga mis märgiti ära kui teaduslikult huvipakkuvad variandid, kuna olid spetsiifilised Eesti ja/või Soome populatsioonidele või oli tegemist esmakordselt leitud mutatsioonidega, mida polnud varem

kirjeldatud. Niiviisi allesjäänud 152 leiu 99 unikaalset varianti klassifitseeriti lisade 1 ja 2 abil, mis juhenduvad ACMG ja AMP 2015. aasta juhendist.

Patogeenseks või tõenäoliselt patogeenseks hinnati antud töös 46 unikaalset varianti, millele vastas 63 leidu. Variandid on kujutatud joonisel 7, kus nad on eristatud värvidega mutatsiooni liigi järgi – sinine tähistab missenss-mutatsiooni, oranž nonsenss-mutatsiooni, punane raaminihkemutatsiooni ning lilla muutust splaissimisel. Joonisel 7 on ära märgitud ka kaks splaissidoonorvarianti, millel puudub vastav aminohappe vahetus. Variandid on välja toodud ka lisas 3 koos neile antud hinnangutega WilsonGen ja ClinVari andmebaasides ning neile omistatud ACMG koodidega.



**Joonis 7.** Patogeensed ja tõenäoliselt patogeensete mutatsioonide aminohappe vahetused ATP7B valgul asukoha järgi. Joonisel on näha eksonite piirid katkendliku joonega ning valgul olevad värvid tähistavad erinevaid funktsionaalselt olulisi domeene. Joonis on tehtud veebirakendusega ProteinPaint.

Käesolevas töös antud hinnangud patogeensetele/tõenäoliselt patogeensetele variantidele kattusid WilsonGen omadega 26/46 juhust ning ClinVar omadega 19/46 juhul. 4 variandi puhul puudusid WilsonGen ja ClinVar sissekanded ning 13 variandi puhul olid kõik 3 hinnangut üksmeelsed. Ülejäänud 53 varianti ei olnud võimalik klassifitseerida kriteeriumite nappuse tõttu ning need tuli määrata teadmata mõjuga variantideks (ingl *variant of uncertain significance*, VUS).

Juhtudel, kus antud töö hinnangud ei läinud kokku ClinVar või WilsonGen andmebaaside omadega, oli valdavalt tegemist erisusega, kus üks määras variandi tõenäoliselt patogeenseks ja teine patogeenseks või vastupidi. Siin töös määratud patogeensetest/tõenäoliselt patogeensetest (P/TP) variantidest ei hinnatud teistes andmebaasides ühtegi healoomuliseks/tõenäoliselt healoomuliseks variatsiooniks.

WilsonGen andmebaas on uuem (assambleeritud 2019) ja hõlmab ka ClinVar andmebaasi väliseid andmeid, mis võib olla põhjuseks, et antud töö hinnangud kattusid esimesena mainituga paremini. Samas loetakse kliinilises praktikas siiski kõige usaldusväärsemaks allikaks ClinVar klassifikatsiooni, mistõttu tuleks seda variandi kirjeldamisel mainida eelisjärjekorras.

Kuna antud töös oli ka mitmeid kriteeriume (nt PS2, PM6, PP1, PP4), mille jaoks käesolevas töös andmed puudusid, kui seda polnud konkreetset varasemas kirjanduses välja toodud, siis ei saa võtta siintoodud hinnanguid täielikena (va patogeensed variandid) enne andmete kogumist kõigi kriteeriumite jaoks. Märkimisväärne on veel, et käesolevas töös uuritud kohordis leiti hinnaguliselt patogeenne mutatsioon (p.Lys1437\*) 21. eksonis, kus patogeenseid mutatsioone kirjeldatakse harva.

Sorteerimise tulemusel saadud 106 geenivariandi esinemist võrreldi veel 5 teadusartikliga, millest 3 olid suuremahulised, Euroopas läbi viidud ATP7B geenivariantide populatsiooniuringud Coffey jt. (2013), Balashova jt. (2020) ning Kluska jt. (2019) (vastavalt Ühendkuningriigi, Venemaa ja Poola populatsioonidel). Teised 2 olid ülevaateartiklid, mis koondasid kogu maailmas levinumad ATP7B variandid - Chang ja Hahn (2017) ning Wallace ja Dooley (2020). Lisaks võrreldi lõpptulemuses kajastuvaid variante meie töögrupis varem tehtud analüüsidega NGS andmetel (Vaiküll, 2018)

Käesoleva töö välja valitud 106 geenivariandist oli 58 (millest 37 P/TP) kirjeldatud Wallace ja Dooley (2020) artiklis, 33 (21 P/TP) Coffey jt. (2013) artiklis, 18 (15 P/TP) Chang ja Hahn (2017) artiklis, 12 (10 P/TP) Balashova jt. (2020) artiklis ning 10 (7 P/TP) Kluska jt. (2019) artiklis. Antud töö 41 varianti (sh vaid 5 P/TP varianti) ei olnud mainitud üheski loetletud artiklis ning 44 variandile oli viidatud rohkem kui ühes allikas. Lõplikku valikusse (lisa 3) kuuluvate variantide seas leidis 6, mis kattusid meie töögrupis varem täheldatud leidudega NGS andmestikust (Vaiküll, 2018), samas 3 ülejäänud variandi patogeensuse argumendid jäid selle töö kriteeriumide valguses ebapiisavaks ning nende kohta on vajalik edaspidi koguda lisainfot eelkõige fenotüübiandmete täiendamise teel. Tulemus näitab, et meie patogeensed/tõenäoliselt patogeensed variandid on suures osas esindatud ka teistes Euroopa populatsioonides, kuigi kahjuks polnud kirjutamise hetkel võimalik tulemusi võrrelda nt meie lähinaabrite Soome või Läti populatsioonide andmetega, kuna vastavaid uuringuid polnud avaldatud. Ühtlasi on avaldatud kirjanduses vähe või üldse mitte viidatud Eesti ja/või Soome populatsioonide spetsiifilistele geenivariantidele, mis vajaksid põhjalikumat käsitlust.

Euroopa populatsioonide ATP7B sagedaseimaks patogeenseks mutatsiooniks loetakse p.H1069Q mutatsiooni, mis on patogeenseks märgitud ka käesolevas töös. EGV geenidonorite andmestike kohaselt tuvastati NGSi andmete alusel nimetatud mutatsiooni suhtes 64 heterosügootset indiviidi ning imputatsiooni andmete alusel 1957 heterosügooti ja 6 alternatiivset homosügooti. Tulevikus tuleks kindlasti antud arvud teise meetodiga (nt Sangeri sekveneerimine) üle kontrollida. Väärtuslikku informatsiooni pakuks ka nende indiviidide fenotüüpide uurimine koos genotüüpidega, eriti neil, kel esineb H1069Q mutatsioon *trans*-asendis mõne teise patogeense või tõenäoliselt patogeense geenivariandiga. Mainimisväärtus on ka tõik, et imputeerimise andmete kohaselt oleks EGV kohordis H1069Q mutatsiooni MAF 0,0065, mis ületab ACMG juhiste järgi maksimaalset eeldatava patogeense variandi sagedust (0,0054), kuid ometi on tegemist ATP7B geeni kõige paremini tõendatud patogeense geenivariandiga.

Edasi valiti koos juhendajaga välja RHK-10 (Rahvusvaheline Haiguste Klassifikaator-10) koodid (lisa 4), mida võiks seostada Wilsoni tõvega ning mille alusel oleks võimalik otsida geenidonorite hulgast neid, kel võiks potentsiaalselt olla Wilsoni tõve fenotüüp, kuid kellel on see haigus otseselt diagnoosimata.

Koodid jagati 3 klassi läbi töötatud Wilsoni tõve kohase kirjanduse alusel: defineeriv tunnus ehk I järgu tunnus, II järgu tunnus ja III järgu tunnus. I järgu tunnusteks valiti need, mis kõige täpsemalt võiksid kirjeldada Wilsoni tõve fenotüüpi, II järgu tunnusteks Wilsoni tõve fenotüübiga sageli seostatavad, aga vähem spetsiifilised tunnused, ning III järgu tunnusteks määrati kõige ebamäärasemad tunnused. Tabelisse on lisatud ka IV järgu tunnuste veerg, kuhu on tehtud märge nende tunnuste kohta, mis on piisavalt ebaspetsiifilised ning laialdaselt esinevad, nii et neid võiks pigem lugeda uuritavate seas Wilsoni tõve diagnoosi välistavaks tunnuseks või rakendada välistavana kontrollgrupi puhastamiseks.

EGV andmebaasi kogutud fenotüübiandmetes kajastuvad diagnoosikoodid, mille algallikateks on Inimgeeniuringute seaduse alusel geenidonorite ütluste ja tema kohta raviasutuses hoitavate andmete põhjal geenidonoriks saamisel koostatud tervises seisundi kirjeldused, mida on perioodiliselt täiendatud teistest andmebaasidest (Eesti Haigekassa, Tervise infosüsteem, Tartu Ülikooli Kliinikum, Põhja-Eesti Regionaalhaigla, Surma põhjuste register ja Vähiregister), kui geenidonor pole seda keelanud.

Töö juhendaja tegi Eesti Geenivaramu andmebaasist väljavõtte (veerud 7-11 lisas 4), kus on märgitud diagnoosikoodidele vastavate isikute arvud geenidonorite hulgas koodide mainimise sageduse järgi (mainitud 1 kord, mainitud mitu korda kuni 1 aasta jooksul, mainitud mitu korda rohkem kui 5 aasta jooksul). EGV andmebaasist tehtud väljavõtte kajastas 10.07.2020 seisuga kokku 162 727 indiviidi fenotüübiandmeid ja hõlmas 15 186 erinevat RHK-10 koodi.

Wilsoni tõbe tähistavaks koodiks RHK-10 järgi on E83.0 (vaseainevahetuse häired, sealhulgas Menkese tõbi ja Wilsoni tõbi), EGV andmebaasis leidis seda koodi kokku 32 indiviidil ning neist vaid ühel oli lisatud kood E83.0\_3, mis tähistas just Wilsoni tõbe. Siit tuleb välja, et Wilsoni tõve diagnoosimine vajaks kliinilistele andmetele lisaks ka genotüübiandmeid, et aladiagnoosimist vähendada ning et täiendavad uuringud on vajalikud indiviididele, kelle fenotüüp ja genotüüp koos viitavad Wilsoni tõve kahtlusele.

Defineerivateks ehk I järgu tunnusteks määrati 8 tunnust: vaseainevahetuse häired (sh Menkese ja Wilsoni tõbi), Wilsoni tõbi, parkinsonism mujal klassifitseeritud haiguste korral, ekstrapüramidaal- ja liigutushäired mujal klassifitseeritud haiguste korral, muud täpsustatud maksahaigused, raskmetallide tekkene nefropaatia, neeru tubulointerstitsiaal-haigusseisundid ainevanetushaiguste (sh Wilsoni tõve) korral, vere mineraalne (sh vask) taseme hälbeline leid. Defineerivate tunnuste kaudu on võimalik leida esmane minimaalne valim EGV kohordist, mida tulevikus genotüübiandmete järgi edasi uurida.

## KOKKUVÕTE

Wilsoni tõbe põhjustava defektse ATP7B geeni mutatsioonispekter on lai ning sageli sõltuv päritolupopulatsioonist. Tegemist on haigusega, mille varieeruv penetrantsus ja mitmekesine sümptomaatika raskendavad diagnoosimist ning seetõttu võivad Wilsoni tõve juhud jääda sageli diagnoosimata. Õigeaegne diagnoos ja ravi on aga väga olulised, kuna see pärilik haigus on raviga täielikult kontrollitav, seevastu ravimata jätmisel võib olla tulemus elukvaliteeti oluliselt halvendav või letaalne.

ATP7B geen figureerib alates 2016. aastast Ameerika Ühendriikide meditsiinigeneetika kolleegiumi ACMG nimekirjas, kus on geenid, mida tuleks soovituslikult patsiendile raporteerida sekundaarsete leidudena, kui leitud on nende patogeenne või tõenäoliselt patogeenne geenivariant. ACMG ja AMP on 2015. aastal avaldanud juhendi, mille alusel on võimalik variandi päritolupopulatsiooni, alleelide, bioinformaatiliste ja ennustuslike andmete ning funktsionaalsete uuringute alusel klassifitseerida geenivariandid vastavasse patogeensuse klassi. Seda juhendit on järgitud ka antud töös.

Töös leitud olulisemad tulemused on järgnevad:

- Käesolevas töös töötati välja algoritm, mille põhjal sõeluti Eesti Geenivaramu geenidoonorite andmestikest välja 106 teaduslikult huvipakkuvat ATP7B geenivarianti.
- EGV kohordis esinenud ATP7B geenivariantidest hinnati ACMG juhiste järgi 46 varianti patogeenseks või tõenäoliselt patogeenseks.
- EGV kohordi fenotüübi andmed RHK-10 koodide alusel näitasid, et on põhjust arvata, et Wilsoni tõbi on Eestis aladiagnoositud ning et diagnoosimisel on oluline arvestada ka genotüübiandmeid.
- Tulevikus on antud töö põhjal võimalik edasi minna Wilsoni tõve uurimisega EGV geenidoonorite andmestike alusel, kasutades siin välja toodud kriteeriume valimi defineerimiseks. Soovituslik on esmajärjekorras tähelepanu pöörata patogeense või tõenäoliselt patogeense geenivariandi suhtes alternatiivsetele homosügootidele ning heterosügootidele, kellel on H1069Q mutatsioon *trans*-asendis teise patogeense või tõenäoliselt patogeense ATP7B geenivariandiga.



## **ATP7B gene: mutation spectrum in the Estonian Biobank cohort**

Miriam Nurm

### **Summary**

Wilson's disease is an autosomal recessive disorder that is caused by a defect in the ATP7B gene. The ATP7B protein is responsible for the intracellular transport of copper and a deficiency in the protein's structure or function may cause an excessive copper buildup in cells, resulting most often in neurodegeneration and liver dysfunction. Wilson's disease is one of the few hereditary diseases that has readily available lifelong treatment; however, when diagnosis or treatment are delayed, the consequences may be severely damaging to one's quality of life or even lethal. As such, it is very important to detect the individuals potentially affected by the disease as early as possible.

More than 1 000 mutations have been found in the ATP7B gene with the missense mutation p.H1069Q being the most frequent pathogenic mutation in European populations. The American College of Medical Genetics (ACMG) has published the guidelines necessary for the classification of gene variants based on their pathogenicity in 2015. The ACMG added the ATP7B gene to their recommended list of genes to report as secondary findings in 2016, suggesting that both pathogenic and likely pathogenic variants of ATP7B should be reported.

The aim of this thesis was to compose a comprehensive and up to date review of Wilson's disease in Estonian, to map potential pathogenic variants in the Estonian Genome Center cohort, which is representative of the Estonian population, and to determine whether the biobank's phenotype data could be used to carry out further studies on Wilson's disease in Estonia.

The main findings of this study were the identification of 106 ATP7B gene variants of interest in the Estonian population, the ACMG guidelines based classification of 46 pathogenic or likely pathogenic variants present in the cohort as well as the fact that based on both genotype and phenotype data, Wilson's disease is likely underdiagnosed in Estonia. It was concluded that the genotype and phenotype data collected by the Estonian Genome Center would be sufficient to launch a pilot project for reporting variants found in the ATP7B gene with primary interest in individuals who are compound heterozygotes for the H1069Q mutation with an additional pathogenic or likely pathogenic variant in *trans* and alternative homozygotes for other pathogenic or likely pathogenic variants.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma suurepärast juhendajat Anu Reigot põhjalikkuse eest töö juhendamisel ja pühendumuse eest minu harimisel teadusliku rohujuure tasandist alates viimase 4 aasta jooksul.

Lisaks tänan Margit Nõukast genotüübiandmete väljavõtte ja selgituste eest ning Eesti Geenivaramu meditsiinigenoomika töögrupi liikmeid Marili Paloveri ja Tiit Nikopensiust põhjalike arutelude ja uute mõistete selgitamise eest. Soovin tänada ka töögrupi juhti Neeme Tõnissoni võimaluse eest osaleda praktikas rakendatava lahenduse väljatöötamisel, millest oleks otseselt kasu uuringus osalevate inimeste tervisele.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Ariöz, C., Li, Y., and Wittung-Stafshede, P. (2017). The six metal binding domains in human copper transporter, ATP7B: molecular biophysics and disease-causing mutations. *BioMetals*, 30 : 823–840
- Balashova, M. S., Tuluzanovskaya, I. G., Glotov, O. S., ... Asanov, A. Y. (2020). The spectrum of pathogenic variants of the ATP7B gene in Wilson disease in the Russian Federation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 59: 126420.
- Bost, M., Piguet-Lacroix, G., Parant, F., and Wilson, C. M. R. (2012). Molecular analysis of Wilson patients: Direct sequencing and MLPA analysis in the ATP7B gene and Atox1 and COMMD1 gene analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2–3): 97–101.
- Brewer, G. J., Dick, R. D., Johnson, V. D., Fink, J. K., Kluin, K. J., & Daniels, S. (2001). Treatment of Wilson's disease with zinc XVI: Treatment during the pediatric years. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 137(3): 191–198.
- Bull, P. C., Thomas, G. R., Rommens, J. M., Forbes, J. R., and Cox, D. W. (1993). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genetics*, 5(4): 327–337.
- Cater, M. A., Forbes, J., La Fontaine, S., Cox, D., and Mercer, J. F. B. (2004). Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites. *The Biochemical Journal*, 380(Pt 3): 805–813.
- Cater, M. A., La Fontaine, S., and Mercer, J. F. B. (2007). Copper binding to the N-terminal metal-binding sites or the CPC motif is not essential for copper-induced trafficking of the human Wilson protein (ATP7B). *The Biochemical Journal*, 401(1): 143–153.
- Chang, I. J., and Hahn, S. H. (2017). Chapter 3 - The genetics of Wilson disease. p. 19-34. *In* Czlonkowska, A. (ed.), and Schilsky M.L. (ed.) *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 142. Elsevier, Cambridge.
- Chen, C., Shen, B., Xiao, J. J., Wu, R., Canning, S. J. D., and Wang, X. P. (2015). Currently clinical views on genetics of Wilson's disease. *Chinese Medical Journal*, 128(13): 1826–1830.
- Coffey, A. J., Durkie, M., Hague, S., ... Bandmann, O. (2013). A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain*, 136(5): 1476–1487.
- Collet, C., Laplanche, J. L., Page, J., Morel, H., Woimant, F., and Poujois, A. (2018). High genetic carrier frequency of Wilson's disease in France: Discrepancies with clinical prevalence. *BMC Medical Genetics* 19(1) : 1–6.
- Członkowska, A., Gromadzka, G., and Chabik, G. (2009). Monozygotic female twins discordant for phenotype of Wilson's disease. *Movement Disorders*, 24(7): 1066–1069.

- Czlonkowska, A., Litwin, T., Dusek, P., Ferenci, P., Lutsenko, S., Medici, V., Rybakowski, J. K., Weiss, K. H., and Schilsky, M. L. (2018). Wilson Disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4 (21).
- Dayem Ullah, A. Z., Lemoine, N. R., & Chelala, C. (2013). A practical guide for the functional annotation of genetic variations using SNPnexus. *Briefings in Bioinformatics*, 14(4) : 437–447.
- Dmitriev, O. Y., Bhattacharjee, A., Nokhrin, S., Uhlemann, E.-M. E., and Lutsenko, S. (2011). Difference in Stability of the N-domain Underlies Distinct Intracellular Properties of the E1064A and H1069Q Mutants of Copper-transporting ATPase ATP7B. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18): 16355–16362
- Dong, C., Wei, P., Jian, X., Gibbs, R., Boerwinkle, E., Wang, K. And Liu, X. (2015) Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum. Mol. Gen.*, 24: 2125–2137.
- Espinós, C. and Ferenci, P. (2020). Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? *JHEP Reports*, 2(4) : 100114.
- Gao, J., Brackley, S., and Mann, J. P. (2019). The global prevalence of Wilson disease from next-generation sequencing data. *Genetics in Medicine*, 21(5): 1155–1163.
- Gerosa, C., Fanni, D., Congiu, T., Piras, M., Cau, F., Moi, M., and Faa, G. (2019). Liver pathology in Wilson's disease: From copper overload to cirrhosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193: 106–111.
- Ghosh, R., Oak, N. and Plon, S.E. (2017). Evaluation of *in silico* algorithms for use with ACMG/AMP clinical variant interpretation guidelines. *Genome Biol* 18: 225.
- Guillaud O., Brunet, A-S., Mallet, I., Dumortier, J., Pelosse, M., Heissat, S., Rivet, C., Lachaux, A., and Bost, M. (2017). *Liver International*, 38(2): 350-357
- Guillaud, O., Dumortier, J., Sobesky, R. ... Duclos-Vallée, J. C. (2014). Long term results of liver transplantation for Wilson's disease: Experience in France. *Journal of Hepatology*, 60(3) : 579–589.
- Guo, Y., Nyasae, L., Braiterman, L. T., and Hubbard, A. L. (2005). NH<sub>2</sub>-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(5 52-5): 904–916.
- Huster, D., Finegold, M. J., Morgan, C. T., Burkhead, J. L., Nixon, R., Vanderwerf, S. M., Gilliam C.T. and Lutsenko, S. (2006). Consequences of copper accumulation in the livers of the Atp7b<sup>-/-</sup> (Wilson disease gene) knockout mice. *The American Journal of Pathology*, 168(2): 423–434.
- Jayakanthan, S., Braiterman, L. T., Hasan, N. M., Unger, V. M., and Lutsenko, S. (2017). Human copper transporter ATP7B (Wilson disease protein) forms stable dimers in vitro and in cells. *Journal of Biological Chemistry* 292(46):18760–18774.

- Kaler, S. G., and Packman, S. 2013. Chapter 100 - Inherited disorders of human copper metabolism p. 1-21. *In* D. Rimoin (ed.), R. Pyeritz (ed.), and B. Korf (ed.), Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 6<sup>th</sup> ed. Elsevier, Cambridge.
- Kalia, S. S., Adelman, K., Bale, S. J. ... Miller, D. T. (2017). Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, 19(2): 249–255
- Kegley, K. M., Sellers, M. A., Ferber, M. J., Johnson, M. W., Joelson, D. W., and Shrestha, R. (2010). Fulminant Wilson's Disease Requiring Liver Transplantation in One Monozygotic Twin Despite Identical Genetic Mutation. *American Journal of Transplantation*, 10(5) : 1325–1329.
- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., Roak, B. J. O., Cooper, G. M., and Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 46: 310–315.
- Kirk, R. 2019. Chapter 14 – The ATP7B gene, p. 143-152. *In* Kerkar, N. (ed), Roberts, E.A. (ed), *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Academic Press, Cambridge.
- Kluska, A., Kulecka, M., Litwin, T., ... Ostrowski, J. (2019). Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic variants across the ATP7B gene and some modifiers of Wilson's disease phenotype. *Liver International*, 39(1) : 177–186.
- Kumar, M., Gaharwar, U., Paul, S., Poojary, M., Pandhare, K., Scaria, V., and Bk, B. (2020). WilsonGen a comprehensive clinically annotated genomic variant resource for Wilson's Disease. *Scientific Reports*, 10(1) : 1–6.
- Kumar, N., Gross, J. B. and Ahlskog, J. E.. (2004). Copper deficiency myelopathy produces a clinical picture like subacute. *Neurology*, 63: 33-39
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., ... Maglott, D. R. (2018). ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*, 46(D1): D1062–D1067.
- Li, J., Zhao, T., Zhang, Y., Zhang, K., Shi, L., Chen, Y., Wang, X., and Sun, Z. (2018). Performance evaluation of pathogenicity-computation methods for missense variants, *Nucleic Acids Research*, 46 (15):7793–7804.
- Lee, B. H., Kim, J. H., Lee, S. Y., ... Yoo, H.-W. (2011). Distinct clinical courses according to presenting phenotypes and their correlations to ATP7B mutations in a large Wilson's disease cohort. *Liver International*, 31(6) : 831–839.przyby
- Lenartowicz, M., and Krzeptowski, W. (2010). Structure and function of ATP7A and ATP7B proteins--Cu-transporting ATPases. *Postepy Biochemii* 56(3): 317–327.

- Lorincz, M. T. (2018). Chapter 18 - Wilson disease and related copper disorders, p. 279-292. In Geschwind, D.H. (ed.), Paulson, H.L. (ed.) and Klein, C. (ed.) Handbook of Clinical Neurology, vol 147. Elsevier, Cambridge.
- Loudianos, G., Incollu, S., Mameli, E., and Lepori, M. B. (2016). Wilson's disease in an adult asymptomatic patient: A potential role for modifying factors of copper metabolism. *Annals of Gastroenterology*, 29(1) : 96–98
- Lutsenko, S (2014) Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson's disease. *Ann NY Acad Sci*, 1315: 56–63
- Morgan, C. T., Tsivkovskii, R., Kosinsky, Y. A., Efremov, R. G., and Lutsenko, S. (2004). The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human copper-transporting ATPase: Analysis of the Wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35) : 36363–36371.
- Mustafa, M.S. and Shamina, A.H. (1998) Five successful deliveries following 9 consecutive spontaneous abortions in a patient with Wilson disease. *Aust NZ J Obstet Gyn*, 38:312–314.
- Park, S., Park, J.-Y., Kim, G.-H., Choi, J.-H., Kim, K.-M., Kim, J.-B., and Yoo, H.-W. (2007). Identification of novel ATP7B gene mutations and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. *Human Mutation*, 28(11): 1108–1113.
- Petrukhin, K., Fischer, S. G., Pirastu, M., ... Gilliam, T. C. (1993). Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nature Genetics*, 5(4): 338–343
- Poujois, A., Chaine, P., and Woimant, F. (2018). Wilson's disease in 2018. *Pratique Neurologique - FMC*, 9(3) : 173–185.
- Pronicki, M. 2017. Chapter 7 - Wilson disease – liver pathology, p. 71-75. In Czlonkowska, A. (ed.), and Schilsky M.L. (ed.) Handbook of Clinical Neurology, vol. 142. Elsevier, Cambridge.
- Przybyłkowski, A., Gromadzka, G., and Członkowska, A. (2014). Polymorphisms of metal transporter genes DMT1 and ATP7A in Wilson's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(1): 8–12
- Reuner, U. and Dinger, J. Pregnancy and Wilson disease: management and outcome of mother and newborns—experiences of a perinatal centre. *Annals of Translational Medicine*, 7(Suppl 2):S56.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., and Das, S. (2015). ACMG Standards and Guidelines Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.*, 17(5) : 405–424.

- Scheinberg, I.H. and Sternlieb, I. (1984) Wilson's Disease. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Schmitt, F., Podevin, G., Poupon, J., Roux, J., Legras, P., Trocello, J.-M., Woimant, F., Laprevote, O., Nguyen, T.H. and Balkhi, S. El. (2013). Evolution of Exchangeable Copper and Relative Exchangeable Copper through the Course of Wilson ' s Disease in the Long Evans Cinnamon Rat. PLoS ONE 8(12): 1–12.
- Simon, I., Schaefer, M., Reichert, J., and Stremmel, W. (2008). Analysis of the human Atox 1 homologue in Wilson patients. World Journal of Gastroenterology, 14(15): 2383–2387.
- Skowronska, M., Litwin, T., Kurkowska-Jastrzębska, I. and Członkowska, A. (2020). Transcranial sonography changes in heterozygotic carriers of the ATP7B gene. Neurological Sciences.
- Squitti, R., Siotto, M., Bucossi, S., and Polimanti, R. (2014). In silico investigation of the ATP7B gene: insights from functional prediction of non-synonymous substitution to protein structure. Biometals, 27(1): 53–64.
- Stapelbroek, J. M., Bollen, C. W., Ploos van Amstel, J. K., van Erpecum, K. J., van Hattum, J., van den Berg, L. H., Klomp L.W.J. and Houwen, R. H. J. (2004). The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. Journal of Hepatology, 41(5): 758–763.
- Steindl, P., Ferenci, P., Dienes, H. P., ... Gangl, A. (1997). Wilson's disease in patients presenting with liver disease: A diagnostic challenge. Gastroenterology, 113(1) : 212–218.
- Strande, N. T., Brnich, S. E., Roman, T. S., and Berg, J. S. (2018). Navigating the nuances of clinical sequence variant interpretation in Mendelian disease. Genetics in Medicine, 20(9): 918–926.
- Stättermayer, A. F., Entenmann, A., Gschwantler, M., Zoller, H., Hofer, H., and Ferenci, P. (2019). The dilemma to diagnose Wilson disease by genetic testing alone. European Journal of Clinical Investigation, 49(8) : 1–6.
- Tanzi, R. E., Petrukhin, K., Chernov, I., ... Gilliam, T. C. (1993). The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. Nature Genetics, 5(4): 344–350.
- Theise, N.D. 2015. Chapter 18 – Liver and Gallbladder, p. 822-851. *In* Kumar, V. (ed.), Abbas, A.K. (ed.), and Aster, J (ed.) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9<sup>th</sup> ed. Elsevier, Cambridge.
- Thusberg, J., Olatubosun, A., and Vihinen, M. (2011). Performance of Mutation Pathogenicity Prediction Methods on Missense Variants. Hum Mutat., 32(4):358-368.
- Vaiküll, K. (2018). Sekkumist võimaldavad geenivariandid TÜ Eesti Geenivaramu valimis – haigusseoselisuse tuvastamine ja võimalik kasutamine geneetilises tagasisides. Magistritöö. Tartu Ülikool, Molekulaar- ja rakubioloogia instituut.

- Volpert, H. M., Pfeiffenberger, J., Gröner, J. B., Stremmel, W., Gotthardt, D. N., Schäfer, M., Weiss K.H., and Weiler, M. (2017). Comparative assessment of clinical rating scales in Wilson's disease. *BMC Neurol.*, 17: 140
- Walker, J. M., Huster, D., Ralle, M., Morgan, C. T., Blackburn, N. J., and Lutsenko, S. (2004). The N-terminal Metal-binding Site 2 of the Wilson's Disease Protein Plays a Key Role in the Transfer of Copper from Atox1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15) : 15376–15384.
- Wallace, D.F. and Dooley, J.S. (2020) ATP7B variant penetrance explains differences between genetic and clinical prevalence estimates for Wilson disease. *Hum Genet*, 139(8):1065-1075.
- Walshe, J. M., and Yealland, M. (1992). Wilson's disease: the problem of delayed diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 55(8): 692 – 696.
- Weiss, K. H., Runz, H., Noe, B., Gotthardt, D. N., Merle, U., Ferenci, P., Stommel W. and Füllekrug, J. (2010). Genetic analysis of BIRC4/XIAP as a putative modifier gene of Wilson disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(S3): 233–240.
- Woimant, F., Djebrani-Oussedik, N., and Poujois, A. (2019). New tools for Wilson ' s disease diagnosis : exchangeable copper fraction. *Annals of Translational Medicine* 7(Suppl 2):S70



## KASUTATUD VEEBILEHED

The National Institute of Health. GTEx andmebaasi koduleht.

<https://www.gtexportal.org/home/gene/ATP7B>

(loetud 31.07.2020)

Institute of Medical Genetics in Cardiff. Human Gene Mutation Database koduleht.

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=ATP7B>

(loetud 19.07.2020)

Barts Cancer Institute. SNP-nexus version 4.

<https://www.snp-nexus.org/v4/>

(loetud 18.07.2020)

CSIR Institute of Genomics and Integrative Biology. WilsonGen andmebaas.

<http://clingen.igib.res.in/WilsonGen/index.html>

(loetud 19.07.2020)

Illumina Global Screening Array geenikiibi infoleht.

<https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/infinium-global-screening-array-data-sheet-370-2016-016.pdf>

(loetud 7.08.2020)

St. Jude Children's Research Hospital. ProteinPaint.

<https://proteinpaint.stjude.org/>

(vaadatud 2.08.2020)

# LISAD

Lisa 1. Patogeensete variantide klassifikatsiooni kriteeriumid Richards jt. (2015) järgi.

<b>Väga tugev argument patogeensuse poolt</b>	
<b>PVS1</b>	<p><i>Null-variant</i> (nonsenss- või raaminihkemutatsioon, peatranskriptil +/- 1 või 2 splaiss-saiti või koodonit, ühe või mitme eksoni deletsioon) geenis, kus funktsiooni kaotus (ingl <i>loss of function, LOF</i>) on teadaolev haiguse toimetehhanism</p> <p>Erandid:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ettevaatust tasub rakendada geenide korral, kus LOF ei ole teadaolev haiguse toimetehhanism</li> <li>• Ettevaatust tasub rakendada LOF variantide puhul, mis asuvad geeni 3' otsas</li> <li>• Ettevaatust tasub rakendada splaiss-variantide korral, mille tulemusena jäetakse ekson vahele, kuid ülejäänud valk jääb puutumata</li> <li>• Ettevaatust tasub rakendada, kui geenil on rohkem kui üks transkript</li> </ul>
<b>Tugev argument patogeensuse poolt</b>	
<b>PS1</b>	<p>Sama aminohappevahetus kui juba kinnitatud patogeensel variandil, nukleotiidimuutusest olenemata</p> <p>Erand: Ettevaatust tasub rakendada muutuste puhul, mis mõjuvad pigem splaissingu tasemel kui aminohappe/valgu tasemel</p>
<b>PS2</b>	<i>De novo</i> (haigel patsiendil on kontrollitud nii ema kui ka isa genotüüp ning puuduvad juhtumid perekonnas)
<b>PS3</b>	<p>Hästi tõendatud <i>in vitro</i> või <i>in vivo</i> funktsionaalsed uuringud, mis kinnitavad geeni või geeni produkti kahjulikkust</p> <p>Märkus: eelistatud on valideeritud funktsionaalsed uuringud, mida on võimalik korrata ning mis on usaldusväärsed kliinilises diagnostikas</p>
<b>PS4</b>	<p>Variandi levimus sümptomitega isikutel on oluliselt suurem kui kontrollidel</p> <p>Märkus 1: Suhteline risk (RR) või šansside suhe (OR) (nagu näidatud juhtumianalüüsides) peab olema üle 5.0 ning RR või OR hinnangule ligilähedane usaldusvahemik (CI) ei sisalda 1.0. Richards jt. (2015) on välja toodud detailid.</p> <p>Märkus 2: väga harvade variantide puhul võib kasutada mõõduka tõendusena ka variandi esinemist mitmel omavahel mitte seotud, sama fenotüübiga patsiendil ja kontrollil, kui juht-kontrolluuringutes ei tuvastata statistiliselt olulist erinevust</p>
<b>Mõõdukas argument patogeensuse poolt</b>	
<b>PM1</b>	Variant asub mutatsioonilises sõlmpunktis ja/või kriitilises ning hästi uuritud funktsionaalses domeenis ja tegemist pole healoomulise variatsiooniga
<b>PM2</b>	<p>Variant puudub <i>Exome Sequencing Project, 1000 Genomes</i> või ExAC kontrollidest (või on väga madala sagedusega, kui haigus on retsessiivne) (vdke Richards jt., 2015)</p> <p>Erand: Populatsiooni andmed indelide kohta võivad olla puudulikud NGS-i kasutades</p>
<b>PM3</b>	<p>Kui tegemist on retsessiivse haigusega, siis kvalifitseeruvad PM3 alla variandid, mida tuvastatakse <i>trans</i> asendis patogeense variandiga</p> <p>Märkus: vajab kas patsiendi vanemate või järglaste testimist</p>
<b>PM4</b>	Valgu pikkus muutub raaminihke deletsiooni või insertiooni tõttu mittekorduvas regioonis või stopp-koodonist tingitud kao tõttu
<b>PM5</b>	<p>Varasemalt kirjeldamata missenss-mutatsioon aminohappe järgis, kus on varem leitud mõni teine patogeenne missenss-mutatsioon</p> <p>Erand: Ettevaatust tasub rakendada variantide puhul, mis mõjuvad pigem splaissingu tasemel kui aminohappe/valgu tasemel</p>
<b>PM6</b>	Arvatav <i>de novo</i> mutatsioon, aga ilma isa ja ema genotüüpide testimiseta

Patogeensust toetav argument	
PP1	Haiguse kosegregatsioon mitme sümptomaatilise pereliikmega ning geenis, mis on kindlalt tuvastatud selle haiguse põhjustajana
	Märkus: võib kasutada tugevama argumendina, kui segregatsiooni andmeid selle haiguse kohta on rohkem
PP2	Missenss-mutatsioon geenis, kus esineb vähe healoomuliseid missenss-mutatsioone ning kus missenss-mutatsioonid on sageli haiguse põhjustajaks
PP3	Mitu erinevat bioinformaatilist tõendust, mis viitavad geeni või geeniproducti kahjulikkusele (evolutsiooniline konservatsioon, splaissingu mõjud jne)
	Märkus: igat <i>in silico</i> algoritmi ei saa lugeda eraldi kriteeriumiks. PP3 võib kasutada ainult ühe korra variandile hinnangu andmisel.
PP4	Patsiendi fenotüüp või perekonna anamnees sobib spetsiifiliselt kokku haigusega, mis on teadaolevalt põhjustatud ühe geeni poolt
PP5	Usaldusväärse allika kohaselt on variant patogeenne, aga tõendusmaterjal pole kättesaadav iseseisva hinnangu andmiseks

Lisa 2. Variantide patogeensuse klassifikatsioon ACMG ja AMP juhendi klassidesse koodide alusel, Richards jt. (2015) järgi.

Patogeensuse klassifikatsioon	Argumendid	Alaargumendid
<b>Patogeenne (ingl <i>pathogenic</i>)</b>	1. 1 väga tugev (PVS1) <i>JA</i>	a. $\geq 1$ tugev (PS1–PS4) <i>VÕI</i>
		b. $\geq 2$ mõõdukat (PM1–PM6) <i>VÕI</i>
		c. 1 mõõdukas (PM1–PM6) <i>JA</i> 1 toetav (PP1–PP5) <i>VÕI</i>
		d. $\geq 2$ toetavat (PP1–PP5)
	2. $\geq 2$ tugevat (PS1–PS4) <i>VÕI</i>	
	3. 1 tugev (PS1–PS4) <i>JA</i>	
		a. $\geq 3$ mõõdukat (PM1–PM6) <i>VÕI</i>
		b. 2 mõõdukat (PM1–PM6) <i>JA</i> $\geq 2$ toetavat (PP1–PP5) <i>VÕI</i>
		c. 1 mõõdukas (PM1–PM6) <i>JA</i> $\geq 4$ toetavat (PP1–PP5)
<b>Tõenäoliselt patogeenne (ingl <i>likely pathogenic</i>)</b>	1. 1 väga tugev (PVS1) <i>JA</i> 1 mõõdukas (PM1–PM6) <i>VÕI</i>	
	2. 1 tugev (PS1–PS4) <i>JA</i> 1–2 mõõdukat (PM1–PM6) <i>VÕI</i>	

	3. 1 tugev (PS1–PS4) JA $\geq 2$ toetavat (PP1–PP5) VÕI	
	4. $\geq 3$ mõõdukat (PM1–PM6) VÕI	
	5. 2 mõõdukat (PM1–PM6) JA $\geq 2$ toetavat (PP1–PP5) VÕI	
	6. 1 mõõdukas (PM1–PM6) JA $\geq 4$ toetavat (PP1–PP5)	
<b>Kahjutu (ingl <i>benign</i>)</b>	1. 1 iseseisev (ingl <i>stand-alone</i> ) (BA1) VÕI	
	2. $\geq 2$ tugevat (BS1–BS4)	
<b>Tõenäoliselt kahjutu (ingl <i>likely benign</i>)</b>	1. 1 tugev (BS1–BS4) JA 1 toetav (BP1–BP7) VÕI	
	2. $\geq 2$ toetavat (BP1–BP7)	
*Variandi peaks paigutama teadmata tähtsusega (ingl <i>uncertain significance</i> ) klassi, kui variant ei vasta siintoodud kriteeriumitele või kui kahjutuse ja patogeensuse argumendid on omavahel vastuolus.		

Lisa 3. Eesti geenivaramu kohordi geenandmestike esmasel skriinimisel ATP7B (ENSG00000123191; HGNC:870; MIM:606882) geenis leitud ja ACMG juhiste järgi antud töös patogeenseks või tõenäoliselt patogeenseks klassifitseeritud variandid. Kõik variandid asuvad põhitranskriptil ENST00000242839.10 (NM\_000053.4). **Legend:** P – patogeenne, TP – tõenäoliselt patogeenne, VK – vastukäiv informatsioon.

Positsioon GRCh37 chr 13	SNP/indel ID	Nukleotiidi(de) vahetus	Aminohappe vahetus	Mutatsioon	WilsonGen hinnang	ClinVar hinnang	Antud töö hinnang	ACMG koodid
52508981	rs768833241	c.4309A>T	p.Lys1437*	enneaegne stopp-koodon	-	-	P	PVS1 PM1 PM2 PM4 PP5
52509765	rs776848753	c.4088C>T	p.Ser1363Phe	missenss-mutatsioon	VUS	TP/P	P	PS1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52509795	rs193922110	c.4058G>A	p.Trp1353*	enneaegne stopp-koodon	P	TP/P	P	PVS1 PS1 PM2 PM4 PP3 PP5
52511478	rs193922109	c.3955C>T	p.Arg1319*	enneaegne stopp-koodon	P	P	P	PVS1 PS1 PM1 PM4 PP3 PP5
52511484	rs1057516228	c.3948delG	p.Thr1317fs	raaminihkemutatsioon	P	TP	P	PVS1 PM1 PM2 PM4 PP3
52511620	rs749472361	c.3895C>T	p.Leu1299Val	missenss-mutatsioon	-	-	TP	PM1 PM2 PM5 PP3
52511697	rs758355520	c.3818C>T	p.Pro1273Leu	missenss-mutatsioon	P	P	TP	PS1 PM1 PP3 PP6
52511706	rs121907990	c.3809A>G	p.Asn1270Ser	missenss-mutatsioon	P	P	TP	PS1 PM1 PM3 PP3
52511714	rs1057516740	c.3800delA	p.Asp1267fs	raaminihkemutatsioon	P	TP	P	PVS1 PM1 PM2 PM4 PP3
52511719	rs121907992	c.3796G>A	p.Gly1266Arg	missenss-mutatsioon	P	P	P	PS1 PS3 PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52513198	rs200911496	c.3688A>G	p.Ile1230Val	missenss-mutatsioon	TP	VK	TP	PM2 PM3 PP3 PP4
52513227	rs193922107	c.3659C>T	p.Thr1220Met	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	P	PS1 PM1 PM2 PM3 PP3 PP5
52513240	rs776280797	c.3646G>A	p.Val1216Met	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	TP	PM1 PM3 PP3 PP4 PP5
52513288	rs786204658	c.3598C>T	p.Gln1200*	enneaegne stopp-koodon	P	TP	P	PVS1 PM1 PM2 PP3
52515217	rs786204547	c.3556G>C	p.Gly1186Arg	missenss-mutatsioon ja splaisregiooni variant	TP	TP/P	TP	PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52515330	rs60431989	c.3443T>C	p.Ile1148Thr	missenss-mutatsioon	TP	P	P	PS1 PM1 PM2 PP3 PP5
52516531	rs137853281	c.3402delC	p.Ala1135fs	raaminihkemutatsioon	P	P	P	PVS1 PS1 PM1 PM2 PM4 PP3 PP4 PP5
52516540	rs1312634432	c.3368_3393delC GGCCAGTCAC CTGAATGAGG CTGGC	p.Pro1123fs	raaminihkemutatsioon	-	-	P	PVS1 PM2 PP3
52518281	rs76151636	c.3207C>A	p.His1069Gln	missenss-mutatsioon	P	P	P	PS1 PS3 PS4 PM1 PP1 PP3 PP4 PP5
52518297	rs374094065	c.3191A>C	p.Glu1064Ala	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	P	PS1 PM1 PM3 PM5 PP1 PP3 PP4 PP5
52518367	rs746485916	c.3121C>T	p.Arg1041Trp	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	P	PS1 PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52520469	rs587783307	c.3011A>C	p.Gln1004Pro	missenss-mutatsioon	TP	P	P	PS1 PM1 PM2 PP3 PP5

Positsioon GRCh37 chr 13	SNP/indel ID	Nukleotiidi(de) vahetus	Aminohappe vahetus	Mutatsioon	WilsonGen hinnang	ClinVar hinnang	Antud töö hinnang	ACMG koodid
52520472	rs775055397	c.3008C>T	p.Ala1003Val	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	TP	PS1 PM1 PP3 PP4 PP5
52520473	rs201497300	c.3007G>A	p.Ala1003Thr	missenss-mutatsioon	P	TP/P	P	PS1 PM1 PM2 PM3 PP1 PP3 PP4 PP5
52523797	rs587783306	c.2865+1G>A	-	splaissoonor ja introni variant	P	TP/P	P	PVS1 PM2 PP3
52523835	rs779323689	c.2828G>A	p.Gly943Asp	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	P	PS1 PM1 PM2 PP3 PP4 PP5
52523859	rs750019452	c.2804C>T	p.Thr935Met	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	P	PS1 PS4 PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52523908	rs121907993	c.2755C>G	p.Arg919Gly	missenss-mutatsioon	TP/P	P	P	PS1 PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52524142	rs1057516425	c.2730+1G>A	-	splaissoonor ja introni variant	P	TP	P	PVS1 PM2 PP3
52524450	rs755709270	c.2532delA	p.Val845fs	raaminihkmutatsioon	P	P	P	PVS1 PS1 PM1 PM2 PM3 PM4 PP3 PP4 PP5
52532466	rs137853283	c.2336G>A	p.Trp779*	enneaegne stopp-koodon	P	P	P	PVS1 PS1 PM1 PM2 PP3 PP4 PP5
52532469	rs28942074	c.2333G>T	p.Arg778Leu	missenss-mutatsioon	P	P	P	PS1 PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52532497	rs137853287	c.2304dupC	p.Met769fs	raaminihkmutatsioon	P	P	P	PVS1 PS1 PM1 PM4 PP1 PP3 PP4 PP5
52532497	rs193922103	c.2305A>G	p.Met769Val	missenss-mutatsioon	VUS	TP/P	P	PS3 PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52532509	rs28942075	c.2293G>A	p.Asp765Asn	missenss-mutatsioon	VUS	P	P	PS1 PM1 PM2 PP3 PP5
52532674	rs137853285	c.2128G>A	p.Gly710Ser	missenss-mutatsioon	TP	P	P	PS1 PM1 PM2 PM3 PP3 PP4 PP5
52536042	rs587783299	c.1877G>C	p.Gly626Ala	missenss-mutatsioon	TP	VK	TP	PM1 PM3 PP3 PP4 PP5
52539130	rs753962912	c.1745_1746delT A	p.Ile582fs	raaminihkmutatsioon	P	TP/P	P	PVS1 PM1 PM2 PM4 PP3 PP4 PP5
52542657	rs766906034	c.1630C>T	p.Gln544*	enneaegne stopp-koodon	P	-	P	PVS1 PM1 PM2 PP3
52544701	rs778675259	c.1470C>A	p.Cys490*	enneaegne stopp-koodon	P	TP/P	P	PVS1 PM1 PM2 PP3 PP5
52548491	rs121907999	c.865C>T	p.Gln289*	enneaegne stopp-koodon	P	TP/P	P	PVS1 PM2 PP3 PP4 PP5
52548543	rs572147914	c.813C>A	p.Cys271*	enneaegne stopp-koodon	P	P	P	PVS1 PS1 PP3 PP4 PP5
52548698	rs1229196914	c.658G>T	p.Gly220*	enneaegne stopp-koodon	-	-	P	PVS1 PM2 PP3
52549042	rs753236073	c.314C>A	p.Ser105*	enneaegne stopp-koodon	P	P	P	PVS1 PM1 PM2 PM3 PP3 PP5
52549102	rs786204643	c.254G>T	p.Gly85Val	missenss-mutatsioon	P	TP	TP	PS3 PM1 PM2 PP3
52549234	rs201738967	c.122A>G	p.Asn41Ser	missenss-mutatsioon	TP	TP/P	P	PS1 PS3 PM3 PP3 PP4 PP5

**Lisa 4. Wilsoni tõbi ja selle tunnuseid kajastavad RHK-10 koodid Eesti geenivaramu koondatud fenotüübiandmetes.** Tunnuse järgud kahanevas spetsiifilisuse järjekorras: I ehk defineeriv, II ehk vähem spetsiifiline, III ehk mittespetsiifiline, IV ehk võimalik välistav tunnus. Veerus „Minimaalne esmane valim“ on minimaalne võimalik isikute arv koodirea lõikes, kellel esineb defineerivaid tunnuseid mitu korda. Halli värviga märgistatud lahtrites on isikute arvud, kellel vastav diagnoos on märgitud vaid ühel korral kogu andmestikus või kellel on teada mingi spetsiifiline teine diagnoos sama koodi raames. Lühend „dgn“ = diagnoos.

Diagnoosi kood RHK-10 järgi	Diagnoosi nimetus	Tunnuse järk				Vastava diagnoosiga isikuid				Minimaalne esmane valim
		I	II	III	IV	kokku	dgn ainult 1 kord	dgn mitu korda kuni 1 aasta jooksul	dgn mitu korda rohkem kui 5 aasta jooksul	
D59.8*	Muud omandatud hemolüütilised aneemiad		x			13	5	9	3	
D59.9*	Täpsustamata omandatud hemolüütilised aneemiad		x			26	16	24	0	
E83.0*	Vaseainevahetuse häired (sh Menkese ja Wilsoni tõbi)	x				32	19	26	5	31
<b>E83.0_3</b>	<b>Wilsoni tõbi</b>	x				<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
F32	Depressiivne episood e. depressioon			x		18230	8472	11631	3293	
F32*	Depressiivne episood e. depressioon			x		31812	10789	17562	7841	
F33	Korduv depressiivne häire e korduv depressioon			x		4667	2038	2841	867	
F33*	Korduv depressiivne häire e korduv depressioon			x		11552	3120	5521	3366	
F34	Püsivad meeleoluhäired			x		1278	594	816	223	
F34*	Püsivad meeleoluhäired			x		1894	858	1246	292	
F38	Muud meeleoluhäired			x		712	459	560	60	
F38*	Muud meeleoluhäired			x		998	645	799	75	
F39*	Täpsustamata meeleoluhäire			x		664	452	569	23	
G21.8*	Muu sekundaarne parkinsonism		x			29	8	21	4	
G21.9*	Täpsustamata sekundaarne parkinsonism		x			67	40	58	2	
G22*	Parkinsonism mujal klassifitseeritud haiguste korral	x				15	8	13	0	13
G24	Düstoonia			x		1095	776	879	90	
G24*	Düstoonia			x		2209	1342	1648	252	
G24.8*	Muu düstoonia		x			586	349	461	45	
G24.9*	Täpsustamata düstoonia			x		420	306	367	17	
G25	Muud ekstrapüramidaal- ja liigutushäired		x			172	100	128	18	
G25*	Muud ekstrapüramidaal- ja liigutushäired		x			2646	1010	1881	317	
G25.0*	Essentsiaalne treemor		x			1196	478	843	158	
G25.0_2	Perekondlik treemor				x	3	0	0	2	
G25.2*	Treemori muud täpsustatud vormid		x			288	131	218	18	
G25.2_2	Intensioontreemor e pingsusvärise mine			x		14	2	4	7	
G25.3*	Müokloonus		x			52	27	43	1	
G25.5*	Muu korea			x		15	6	12	2	
G25.8	Muud täpsustatud ekstrapüramidaal- ja liigutushäired			x		845	344	622	71	
G25.8*	Muud täpsustatud ekstrapüramidaal- ja liigutushäired			x		992	341	721	88	
G25.8_2	Rahutute jalgade sündroom				x	180	2	133	10	
G25.9*	Täpsustamata ekstrapüramidaal- ja liigutushäire		x			264	157	228	8	
G26*	Ekstrapüramidaal- ja liigutushäired mujal klassifitseeritud haiguste korral	x				13	6	9	1	10



I41.8*	Müokardiit mujal klassifitseeritud muude haiguste korral			x		120	94	112	1	
K72	Mujal klassifitseerimata maksapuudulikkus		x			45	29	37	3	
K72*	Mujal klassifitseerimata maksapuudulikkus		x			219	110	200	6	
K72.0*	Äge ja alaäge maksapuudulikkus		x			65	35	65	0	
K72.1*	Krooniline maksapuudulikkus		x			42	17	37	1	
K72.9*	Täpsustamata maksapuudulikkus		x			87	50	84	1	
K73	Mujal klassifitseerimata krooniline hepatiit e maksapõletik			x		362	230	281	35	
K73*	Mujal klassifitseerimata krooniline hepatiit e maksapõletik			x		1215	647	881	150	
K73.0*	Mujal klassifitseerimata krooniline püsiv hepatiit		x			117	78	96	9	
K73.1*	Mujal klassifitseerimata krooniline lobulaarhepatiit		x			12	9	11	0	
K73.2*	Mujal klassifitseerimata krooniline aktiivhepatiit		x			83	22	39	24	
K73.8*	Mujal klassifitseerimata muu krooniline hepatiit		x			189	101	141	19	
K73.9*	Täpsustamata krooniline hepatiit		x			671	383	532	50	
K74.0*	Maksafibroos		x			56	30	45	3	
K74.1*	Maksaskleroos		x			13	10	12	0	
K74.2*	Maksafibroos maksaskleroosiga		x			17	1	9	4	
K74.6*	Muu ja täpsustamata maksatsirroos		x			230	57	133	48	
K74.6 7	Portaal(maksa)tsirroos				x	1	0	0	0	
K75.8*	Muud täpsustatud maksapõletikud (sh mittealkohoolne steatohepatiit)		x			91	45	72	7	
K75.9*	Täpsustamata maksapõletik		x			511	303	463	6	
K75.9 2	Teisiti täpsustamata hepatiit			x		10	10	10	0	
K76	Muud maksahaigused			x		780	494	650	42	
K76*	Muud maksahaigused				x	4753	2216	3462	515	
K76.0*	Mujal klassifitseerimata rasvastunud maks		x			2795	1319	2057	270	
K76.7*	Hepatorenaalsündroom		x			80	46	76	0	
K76.8*	Muud täpsustatud maksahaigused	x				579	329	474	40	514
K76.9*	Täpsustamata maksahaigus		x			1129	705	975	41	
N14.3*	Raskmetallide tekkene nefropaatia	x				1	1	1	0	1
N16.3*	Neeru tubulointerstitsiaal-haigusseisundid ainevanetushaiguste (sh Wilsoni tõve) korral	x				6	3	5	0	5
N16.8*	Neeru tubulointerstitsiaal-haigusseisundid muude mujal klassifitseeritud haiguste korral		x			26	18	24	1	
R17*	Täpsustamata ikterus e kollatõbi			x		478	415	471	4	
R25	Ebanormaalsed tahtmatud liigutused			x		48	39	45	1	
R25*	Ebanormaalsed tahtmatud liigutused			x		1038	801	966	17	
R26	Kõnnaku ja liikuvuse ebanormaalsused			x		43	32	41	2	
R26*	Kõnnaku ja liikuvuse ebanormaalsused			x		273	172	239	5	
R47	Mujal klassifitseerimata kõnehäired			x		121	87	108	7	
R47*	Mujal klassifitseerimata kõnehäired			x		965	373	769	67	
R47.8*	Muud ja täpsustamata kõnehäired			x		219	136	198	4	
R78.7*	Raskmetallide (sh vask) taseme hälbeline leid veres		x			3	1	2	0	
R79.0	Vere mineraalne (sh. vask) taseme hälbeline leid	x				92	65	84	0	84
R79.0 4	Raua taseme hälbeline leid veres				x	1	0	0	1	
R82.3*	Verevärvnikkusesus e hemoglobinuuria			x		8	5	8	0	
R82.6*	Peamiselt mittemeditiinilise päritoluga ainete (sh raskmetallide, sh vase) uriinitasemete hälbelised leiud		x			3	2	2	0	
R94.5*	Maksatalitluse uuringuleidude hälbed			x		189	125	165	3	

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Miriam Nurm,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

### **ATP7B geen: mutatsioonispekter Eesti Geenivaramu kohordis**

mille juhendaja on Anu Reigo,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Miriam Nurm*  
**07.08.2020**